

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2024

Terezie Gambová

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Vliv délky fotoperiody na endogenní hladiny cytokininů
v intaktních rostlinách *Arabidopsis thaliana***

Bakalářská práce

Terezie Gambová

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2024

Vedoucí práce: Mgr. Lenka Plačková, Ph.D.

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Akademický rok: 2022/2023

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno příjmení:	Terezie GAMBOVÁ
Osobní číslo:	R21743
Studijní program:	B0511A030011 Molekulární a buněčná biologie
Téma práce:	Vliv délky fotoperiody na endogenní hladiny cytokininů v intaktních rostlinách <i>Arabidopsis thaliana</i>
Zadávací katedra:	Katedra buněčné biologie a genetiky

Zásady pro vypracování

1. Seznámení se s tématem bakalářské práce
2. Shromáždění literárních zdrojů a zpracování rešerše
3. Experimentální práce – výsev a sklizeň rostlin *A. thaliana* pěstovaných při různých světelných podmínkách (8/16h 16/8h 12/12h). Purifikace napěstovaného rostlinného materiálu pomocí StageTip metody a analýza endogenních hladin cytokininů pomocí UHPLC-MS/MS
4. Analýza výsledků a jejich zpracování
5. Kompletace bakalářské práce

Rozsah pracovní zprávy:

Rozsah grafických prací:

Forma zpracování bakalářské práce: tištěná

Seznam doporučené literatury:

1. Taiz L., Zeiger E.: *Plant physiology*. 4th ed. Sunderland, Mass.: Sinauer Associates, c2006.
2. Spíchal L.: Cytokinins – recent news and views of evolutionally old molecules. *Functional Plant Biology*, 39(4), 2012.
3. Kopečná M., Blaschke H., Kopečný D., Vigouroux A., Končítíková R., Novák O., Kotland O., Strnad M., Moréra S., Schwartzberg K.: Structure and Function of Nucleoside Hydrolases from *Physcomitrella patens* and Maize Catalyzing the Hydrolysis of Purine, Pyrimidine, and Cytokinin Ribosides. *Plant Physiology*, 163(4), 1568-1583, 2013.
4. Janečková H., Husičková A., Ferretti U., Prčina M., Pilařová E., Plačková L., Pospíšil P., Doležal K., Špundová M.: The interplay between cytokinins and light during senescence in detached *Arabidopsis* leaves. *Plant, Cell & Environment*, 41(8), 1870-1885, 2018.

5. Galuszka P., Popelková H., Werner T., Frébortová J.: Biochemical Characterization of Cytokinin Oxidases/Dehydrogenases from Arabidopsis thaliana Expressed in Nicotiana tabacum L. *Journal of Plant Growth Regulation*, 26(3), 255-267, 2007.
6. Sakakibara H.: Cytokinins: Activity, Biosynthesis, and Translocation. *Annual Review of Plant Biology*, 57(1), 431-449, 2006.
7. Novák O., Hauserová E., Amakorová P., Doležal K., Strnad M.: Cytokinin profiling in plant tissues using ultra-performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Phytochemistry mass spectrometry*. *Phytochemistry*, 69(11), 2214-2224, 2008.
8. Novák O., Tarkowski P., Tarkowská D., Doležal K., Lenobel R., Strnad M.: Quantitative analysis of cytokinins in plants by liquid chromatography-single-quadrupole mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 480(2), 207-218, 2003.
9. Svačinová J., Novák O., Plačková L., Lenobel R., Holík J., Doležal K.: A new approach for cytokinin isolation from Arabidopsis tissues using miniaturized purification: pipette tip solid-phase extraction. *Plant Methods* 8, 1-14, 2012.

Vedoucí bakalářské práce: **Mgr. Lenka Plačková, Ph.D.**

Laboratoř růstových regulátorů

Datum zadání bakalářské práce: **14. března 2023**

Termín odevzdání bakalářské práce: **31. května 2024**

BIBLIOGRAFICKÉ ÚDAJE

Jméno a příjmení autora:	Terezie Gambová
Název práce:	Vliv délky fotoperiody na endogenní hladiny cytokininů v intaktních rostlinách <i>Arabidopsis thaliana</i>
Typ práce:	bakalářská
Pracoviště:	Katedra buněčné biologie a genetiky, PřF UP v Olomouci
Vedoucí práce:	Mgr. Lenka Plačková Ph.D.
Rok obhajoby práce:	2024

Abstrakt:

Bakalářská práce je zaměřena na stanovení endogenních hladin cytokininů v modelové rostlině *Arabidopsis thaliana* pěstovaných při různých světelných podmínkách (8h/16h, 12h/12h, 16h/8h; světlo/tma) během jednotlivých ročních období (jaro, léto, podzim, zima). Cílem práce bylo zjištění, zda pěstované rostliny mají schopnost rozpoznat jednotlivé roční období i na základě pěstování při regulovaných podmínkách, ve fytotronech. Zároveň byly stanoveny jejich endogenní hladiny jednotlivých cytokininových metabolitů v závislosti jak na ročním období, tak i na různých světelných podmínkách. Cytokinininy se značně podílejí na různých fyziologických procesech rostlin a patří mezi jedny z nejdůležitějších růstových rostlinných hormonů. Jejich koncentrační hladiny jsou během dne ovlivňovány v souvislosti s cirkadiánním rytmem rostlin a jejich hodnoty se mohou značně měnit v průběhu dne. Pro experiment byly použity 10denní semenáčky rostliny *A. thaliana*, které byly zpracovány pomocí purifikační metody StageTip a pro následnou kvantitativní analýzu endogenních hladin cytokininových metabolitů byla použita ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie v zapojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií (UHPLC – MS/MS).

Klíčová slova:	Cytokinininy, cirkadiánní rytmus, <i>Arabidopsis thaliana</i> , StageTip, UHPLC-MS/MS
Počet stran:	70
Počet příloh:	4
Jazyk:	Český

BIBLIOGRAPHICAL IDENTIFICATION

Author's first name and surname:	Terezie Gambová
Title:	Influence of photoperiod on endogenous cytokinin levels in intact <i>Arabidopsis thaliana</i> plants
Type of thesis:	bachelor
Department:	Department of Cell Biology and Genetics, Faculty of Science, Palacký University Olomouc
Supervisor:	Mgr. Lenka Plačková Ph.D.
The year of presentation:	2024

Abstract:

The main aim of this bachelor thesis is to determine the endogenous levels of cytokinins in the model plant *Arabidopsis thaliana* under different light conditions (8h/16h, 12h/12h, 16h/8h) grown in phytotron during different seasons of the year (spring, summer, autumn, winter). The aim of the thesis was to find out whether cultivated plants have the ability to recognize individual seasons even when cultivated under regulated conditions, in phytotrons. At the same time, their endogenous levels of individual cytokinin metabolites were determined depending on both the season and different light conditions. Cytokinins are widely involved in various physiological processes of plants and are among the most important plant growth hormones. Their concentration levels are influenced during the day in connection with the circadian rhythm of plants, and their values can change significantly during the day. The experiment included 10-day-old seedlings of the model plant *A. thaliana* were processed using StageTip purification method and determined by ultra-high-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS) for analysis of endogenous level of cytokinin metabolites.

Keywords:	Cytokinins, circadian rhythm, <i>Arabidopsis thaliana</i> , StageTip, UHPLC-MS/MS
Number of pages:	70
Number of appendices:	4
Language:	czech

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně v průběhu bakalářského studia pod vedením Mgr. Lenky Plačkové, Ph.D. s použitím uvedených literárních zdrojů.

V Olomouci dne

Terezie Gambová

PODĚKOVÁNÍ

Chtěla bych poděkovat zejména mojí vedoucí Mgr. Lence Plačkové, Ph.D. za její ochotu při vedení mé práce a její pomoc při vypracování jak teoretické, tak praktické části a zároveň za její užitečné rady a obětovaný čas strávený v laboratoři. Také bych chtěla poděkovat Mgr. Vladimíře Nožkové, Ph.D. za nastavení podmínek ve fytotronu a kontrolu jeho celkového chodu. Tato bakalářská práce byla realizována s podporou Interní grantové agentury Univerzity Palackého (IGA PrF 2024 013).

Obsah

1 ÚVOD A CÍLE	1
2 LITERÁRNÍ PŘEHLED	2
2.1 Fytohormony	2
2.2 Cytokininy	3
2.3 Struktura cytokininů	3
2.4 Biosyntéza cytokininů	6
2.5 Metabolismus cytokininů	8
2.5.1 Glykosylace	8
2.5.2 Postranní řetězec a jeho modifikace	9
2.5.3 Degradace cytokininů	10
2.6 Transportní cesty cytokininů	11
2.7 Signální transdukce cytokininů a jejich receptory	12
2.8 Hlavní fyziologické účinky cytokininů	14
2.8.1 Buněčné dělení	14
2.8.2 Regulace buněčného dělení	14
2.8.3 Regenerace orgánů	15
2.8.4 Regulace růstu rostliny	16
2.8.5 Apikální dominance	16
2.8.6 Senescence listů	17
2.9 Světlo a jeho vliv na cytokininy	18
2.9.1 Cytokininy a jejich vztah s fytochromy	19
2.9.2 Cytokininy a jejich vztah s kryptochromy	20
2.9.3 Světlo ve vztahu k senescenci listů	20
2.10 Cirkadiánní rytmus ve vztahu s cytokininy	21
2.11 Metody analýzy a detekce cytokininů	23
2.11.1 Purifikace pomocí StageTip	23
2.11.2 Ultra-výkonná kapalinová chromatografie	24

3 MATERIÁL A METODY	25
3.1 Biologický materiál	25
3.2 Chemikálie a použité roztoky	25
3.3 Přístrojové vybavení laboratoře	26
3.4 Příprava biologického materiálu	27
3.4.1 Příprava kultivačního média	27
3.4.2 Výsev rostlin <i>A. thaliana</i>	27
3.4.3 Kultivace rostlin ve fytotronu	27
3.4.4 Sklizení rostlinného materiálu	28
3.5 Příprava vzorků pro analýzu cytokininů	28
3.5.1 Příprava vzorků	28
3.5.2 Extrakce rostlinného materiálu	28
3.5.3 Purifikace rostlinného materiálu	28
3.6 Identifikace a stanovení cytokininů	29
4 VÝSLEDKY	31
5 DISKUZE	36
6 ZÁVĚR	39
7 POUŽITÁ LITERATURA	40
8 PŘÍLOHY	53

Seznam symbolů a zkratek

ABA	kyselina abscisová
ABCG	„ATP-binding cassette“ podskupiny G
ADK	adenosinkináza
ADP	adenosindifosfát
AHK2	Arabidopsis histidinkinaza 2
AHK3	Arabidopsis histidinkinaza 3
AHP	histidin-transferové proteiny
AMP	adenosinmonofosfát
ARR4	Arabidopsis response regulator 4 Arabidopsis regulátor odezvy
ARR9	regulátoru odezvy Arabidopsis typu A
ATP	adenosintrifosfát
BA	6-benzyladenin
CAK	Cyklin-dependentní kináza aktivující kinázy
CCA1	CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1
CDK	cyklin-dependentní kináza
<i>cis</i> ZOG	<i>cis</i> -zeatin <i>O</i> -glukosyltransferáza
<i>cis</i> -ZRMP	<i>cis</i> -zeatin 9-ribosid-5'-monofosfát
CKI1	CYTOKININ INDEPENDANT 1
CKX	cytokininoxidáza/dehydrogenáza
CRE1	receptor cytokininové odpovědi 1 (CYTOKININ RESPONSE 1)
CRF4	CYTOKININ RESPONSE FACTOR 4
CRF5	CYTOKININ RESPONSE FACTOR 5
Crys	krytochromy
<i>cZ</i>	<i>cis</i> -zeatin
<i>cZ7G</i>	<i>cis</i> -zeatin-7-glukosid
<i>cZ9G</i>	<i>cis</i> -zeatin-9-glukosid
<i>cZOG</i>	<i>cis</i> -zeatin <i>O</i> -glukosid
<i>cZR</i>	<i>cis</i> -zeatin ribosid
<i>cZR5'</i> MP	<i>cis</i> -zeatin ribosid-5'-monofosfát
<i>cZROG</i>	<i>cis</i> -zeatin ribosid <i>O</i> -glukosid
DHZ	dihydrozeatin
DHZ7G	dihydrozeatin-7-glukosid
DHZ9G	dihydrozeatin-9-glukosid

DHZOG	dihydrozeatin <i>O</i> -glukosid
DHZR	dihydrozeatin ribosid
DHZR5'MP	dihydrozeatin ribosid-5'-monofosfát
DHZROG	dihydrozeatin ribosid <i>O</i> -glukosid
DMAPP	dimethylallyldifosfát
EC	večerní komplex
ELF3	EARLY FLOWERING 3
ELF4	EARLY FLOWERING 4
ENT	ekvalibrační nukleosidásové transportéry
FAD	flavinadenindinuklotid
FMN	flavinmononukleotid
FW	váha čerstvého materiálu
HK	histidinkinázy
HMBDP	hydroxymethylbutenyldifosfát
HP	histidinofototransferový protein
HPLC	vysoceúčinná kapalinová chromatografie
CHASE doména	„Cyclases Histidin kinases Associated Sensory Extracellular“
iP	isopentenyladenin
iP7G	isopentenyladenin-7-glukosid
iP9G	isopentenyladenin-9-glukosid
iPR	isopentenyladenin ribosid
iPR5'MP	isopentenyladenin ribosid-5'- monofosfát
iPR5'DP	isopentenyladenin ribosid-5'-difosfát
iPR5'TP	isopentenyladenin ribosid-5'-trifosfát
K	kinetin
LHY	„long hypokotyl elongated“
LOG	fosforibohydroláza – „lonely guy“
LUX/PCL1	LUX ARRHYTHMO/PHY TOCLOCK1
MEP	methylethylerythritol fosfátová dráha
MRM	selektivní záznam více iontových reakcí
MVA	mevalonátová dráha
NADPH	nikotinamidadenindinuklotidfosfát
Phots	fototropiny
Phys	fotoreceptory
PRR1	pseudo regulátor odezvy 1
PT-SPE	„pipette tip solid phase extraction“

PUP	purinové permeázy
QqQ	trojitý kvadrupól
RR	regulátor odezvy
Stage Tip	„Stop And Go Extraction Tip“
TCS	dvousložkové signální dráhy
TOC1	TIMING OF CAB EXPRESSION1
tRNA	transportní ribonukleová kyseliny
tRNA IPT	tRNA-isopentenyltransferáza
tZ	<i>trans</i> -zeatin
tZ7G	<i>trans</i> -zeatin-7-glukosid
tZ9G	<i>trans</i> -zeatin -9-glukosid
tZOG	<i>trans</i> -zeatin <i>O</i> -glukosid
tZR	<i>trans</i> -zeatin ribosid
tZR5'MP	<i>trans</i> -zeatin ribosid-5'-monofosfát
tZROG	<i>trans</i> -zeatin ribosid <i>O</i> -glukosid
UDPG	uridindifosfátglukóza
UDPX	uridindifosfátxyulóza
UHPLC	ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie
UHPLC-MS/MS	ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie v zapojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií
UTPG	uridin trifosfát glukóza
AHK4/WOL1	Arabidopsis histidinkinaza – „4wooden leg /AHK4“
ZOG	zeatin <i>O</i> -glukosyltransferáza
ZOX	zeatin <i>O</i> -xylosyltransferáza
ZTL	ZEITLUPE proteiny

Seznam obrázků

Obr. 1: Seznam a struktura isoprenoidních a aromatických cytokininů a jejich metabolitů	5
Obr. 2: Porovnání endogenních hladin cytokininů tZ -typu.....	32
Obr. 3: Porovnání endogenních hladin cytokininů cZ -typu.....	33
Obr. 4: Porovnání endogenních hladin cytokininů DHZ -typu.....	34
Obr. 5: Porovnání endogenních hladin cytokininů iP -typu.....	36

1 ÚVOD A CÍLE

Rostlinné hormony (fytohormony) jsou přirozeně se vyskytující metabolity rostlin pracující již při velmi nízkých koncentračních hladinách hrající klíčovou roli při regulaci různých fyziologických procesů a mající vliv na jejich růst a vývoj (Davies, 2010). Mezi nejvýznamnější rostlinné hormony řadíme auxiny a cytokininy, které jsou mimo jiné klíčovými regulátory růstu a celkového vývoje rostlin. Zároveň oba tyto fytohormony regulují vzájemnou syntézu, což je prokázáno mechanismem vzájemné a zpětné regulace hladin jak auxinů, tak cytokininů (Jones a Ljung, 2011).

Podrobnější studie jedné z klíčových skupin fytohormonů, konkrétně cytokininů, začaly již v roce 1948, kdy vědci Caplin a Steward (1948) objevili v kokosovém mléce sloučeninu ovlivňující proliferaci a dělení buněk. Tímto objevem se nechali inspirovat vědci Skoog, Miller a jejich spolupracovníci, kteří identifikovali vysoce aktivní stimulátor buněčného dělení – kinetin (Miller et al., 1955). Největším převratem v objevení přirozeně se vyskytujících cytokininů v rostlinných tkání byl objev zeatinu z nezralých kukuřičných zrn (Letham, 1963).

Obecně cytokininy hrají v rostlinách důležitou roli především jako signální molekuly na velké vzdálenosti, ale zároveň i v buňkách jejich vzniku (Fathy *et al.*, 2022). Podílejí se na procesech buněčného dělení a diferenciaci, organogeneze, apikální dominance a senescence (Akhtar *et al.*, 2020). Jednotlivé typy cytokininů a jejich aktivita se mohou lišit mezi různými druhy rostlin a jejich tkáněmi, zároveň záleží na odlišných vývojových stádiích a vnějších podmínkách prostředí. Jejich obsah a druh metabolitu může být ovlivněn i světelnými podmínkami a jednotlivými ročními obdobími v souvislosti s cirkadiánním rytmem.

Cirkadiánní rytmus rostlin je založen na vzájemné interakci více komponent a regulačních mechanismů, které vedou k cyklickému 24hodinovému kolísání (Greenham a McClung, 2015). Výzkumy prováděné na různých druzích rostlin napomáhají porozumění jejich chování a zároveň vlastnímu vývoji cirkadiánních rytmů během evoluce (Anwer a Davies, 2013; McClung, 2013). Mimo jiné se cirkadiánní rytmus podílí i na regulaci široké škály jednotlivých procesů probíhajících v rostlinách, jako např. při fotosyntéze, buněčném cyklu, doby kvetení a podílí se také na stresových reakcích reagujících na podněty prostředí a času. Tento jev zajišťuje správné rozdělení zdrojů pro zlepšení kondice a přežití rostlin (Singh a Mas, 2018).

Cílem bakalářské práce bylo vypracování literární rešerše zabývající se cytokininy a jejich vlivu na růst a vývoj rostlin v souvislosti s cirkadiánním rytmem. Náplní experimentální části práce byla aplikace purifikačních a analytických metod, na základě, kterých jsou stanoveny endogenní hladiny jednotlivých typů cytokininů v modelové rostlině *Arabidopsis thaliana* pěstované při různých světelných podmínkách během čtyř ročních období. Součástí práce bylo porovnání vlivu různých světelných podmínek a ročních období na endogenní hladiny cytokininů. Zjištěné poznatky mohou podávat informace o metabolismu a syntéze cytokininů se souvislostí s cirkadiánním rytmem rostlin.

2 LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1 Fytohormony

Jedná se o třídu signálních molekul produkovaných v rostlinných organismech pracujících ve velmi nízkých koncentracích (pmol.g^{-1} – fmol.g^{-1}). Jednotlivé fytohormony jsou účinné v místech jejich produkce a také v cílových oblastech, do kterých jsou transportovány (Vildanova *et al.*, 2014). Mezi rostlinné hormony řadíme - auxiny, cytokininy, gibereliny, kyselinu abscisovou, ethylén, kyselinu jasmonovou, brassinosteroidy, kyselinu salicylovou a strigolaktony (Williams, 2011). Každý z uvedených fytohormonů hraje důležitou roli v odlišných procesech životního cyklu rostlin (Sezgin a Kahya, 2018). Hlavní funkcí fytohormonů je regulace specifických buněčných procesů v rostlinných buňkách od jejich růstu, přes biotické a abiotické reakce na podněty a vnější prostředí, až po jejich smrt (Vildanova *et al.*, 2014).

Syntéza některých specifických hormonů, jako např. kyseliny abscisové (ABA), byla objevena nejen u rostlin, ale i u sinic, hub, různých zvířat a lidí (Blaser *et al.*, 2016). Též se účastní různých vývojových procesů, jako např. dormance semen a pupenů, reguluje otvírání a zavírání průduchů a působí v reakci na stres a vykazuje antagonistický vztah s gibereliny (při dormanci nebo klíčení) (Spence *et al.*, 2015). Gibereliny (GA) se podílejí na podpoře růstu rostlin, urychlují růst výhonků a řadí se k hormonům vylučovaným během stresových podmínek (Bari *et al.*, 2009). Ethylen je jediný plynný rostlinný hormon pomáhající při klíčení semen, kvetení, dozrávání plodů a opadu listů. Kyselina jasmonová (JA) spolu s příbuznými molekulami odvozenými od cyklických mastných kyselin hrají klíčovou roli při regulaci obranných a vývojových procesů rostlin. Dále je důležitá pro kontrolu metabolických aktivit, reprodukci a obranu proti mikrobiálním chorobám a hmyzu. JA je syntetizována v reakci na různé stresy, kterými může být herbivorie nebo napadení patogeny a jako odpověď na tyto stresové podmínky, rostlina produkuje těkavé deriváty jasmonátů (methyljasmonát, (+)-7-isojasmonoyl-I-isoleucin) (Loake *et al.*, 2017). Mezi jeden z nejdůležitějších typů fytohormonů se řadí auxiny, které plní řadu důležitých funkcí v rostlinách, např. při dělení rostlinných buněk, růstu buněk, stimulaci diferenciaci cévních tkání a zpomalení stárnutí listů (Davies, 2010). Mezi jedny z dalších nejdůležitějších fytohormonů se řadí i cytokininy hrající zásadní roli při buněčném dělení, diferenciaci a řadě biologických procesů, jako např. při apikální dominanci, stárnutí listů, diferenciaci chloroplastů apod. (Voller *et al.*, 2017; Hwang *et al.*, 2012).

2.3 Cytokininy

Jsou známé rostlinné hormony, které se vyskytují, jak v přirozené, tak i v syntetické formě. Běžně jsou tyto fytohormony přítomné v rostlinných tkáních a hrají roli v mnoha důležitých rostlinných procesech (Strnad, 1997; Mok a Mok, 2011). Mezi jejich hlavní funkce můžeme zařadit roli při buněčném dělení, diferenciaci a řadě dalších procesů jako např. stárnutí listů, apikální dominance (větvení stonku), transport živin, diferenciaci chloroplastů a aktivaci meristémů (Hwang *et al.*, 2012; Argueso *et al.*, 2012). Mohou též stimulovat diferenciaci i růst axilárních pupenů a hrají roli v interakci s biotickými a abiotickými faktory (Argueso *et al.*, 2012). Na cytokininech je závislá rychlost fotosyntézy a biogeneze chloroplastů, též mohou oddalovat stárnutí květů (Xiao-Ping *et al.*, 2006).

Ve spojení s auxiny jsou základem regeneračních procesů, ve kterých je důležitý poměr zastoupení těchto jednotlivých fytohormonů (Procházka, 1998). Jestliže je poměr auxinů a cytokininů vyrovnaný, tvoří se nediferencovaná pletiva, tzv. kalus. V případě nadbytku cytokininů dochází k regeneraci prýtlů a nadbytek auxinů zase vede ke regeneraci kořene (Miller *et al.*, 1956).

Nedostatek cytokininů je zodpovědný za nižší vzrůst apikálního meristému (primární dělivé pletivo) nebo může způsobovat zakrnutí výhonků. Prostřednictvím signálních drah hrají cytokininy důležitou roli při morfogenezi, signální transdukcii a reagují na různé environmentální stresy, jako je např. sucho, salinita a teplota (Ha *et al.*, 2012).

2.3 Struktura cytokininů

Cytokininy jsou adeninové deriváty obsahující v poloze N6- postranní řetězec ovlivňující jejich biologickou aktivitu. Podle typu postranního řetězce můžeme cytokininy rozdělit na isoprenoidní či aromatické.

Prvním objeveným cytokininem byl kinetin, izolován ze spermatu sledě a pojmenován podle své schopnosti přispívat k buněčnému dělení (Miller *et al.*, 1955; Miller *et al.*, 1956). Cytokininy, které mají jako substituent v poloze N6- isoprenoidní řetězec a dvojnou vazbu se považují za látky s nejvyšší biologickou aktivitou (Kamínek, 1992).

Obecně nejhojněji se vyskytujícím cytokininem v *Arabidopsis* je zeatin, který existuje ve dvou konformačních formách, a to v *trans*- a *cis*- konfiguraci. *Trans*-zeatin je aktivním cytokininem u všech rostlinných druhů, kdežto *cis*-zeatin má nižší biologickou aktivitu např. u *Arabidopsis* (Spíchal *et al.*, 2004; Romanov *et al.*, 2006; Heyl *et al.*, 2012).

Obecně mezi isoprenoidní cytokininy řadíme - *trans*-zeatin (*tZ*), *cis*-zeatin (*cZ*), dihydrozeatin (DHZ) a N⁶-(Δ^2 -izopentenyl) adenin (iP). Cytokininy se mohou vyskytovat jako volné báze, jež jsou biologicky aktivní formou. U dalších cytokininových metabolitů, ribosidů a ribotidů, dochází k poklesu jejich biologické aktivity. V případě ribotidů je to důsledek přítomnosti fosfátové skupiny (Tarkowski

et al., 2004). Snížení až úplná ztráta biologické aktivity může být způsobena i změnou počtu uhlíků v postranním řetězci či při modifikaci adeninové kostry (Procházka, 1998).

Spřažením postranního řetězce cytokininů se sacharidy vznikají *O*-glukosidy, které představují neaktivní, ale stabilní skladovací formy cytokininů. Za pomoci enzymů β -glukosidázy a *O*-glykosyltransferázy je regulována hladina aktivních cytokininů. Při *O*-glykosilaci dochází k navázání sacharidové skupiny (glykanu) na hydroxylovou skupinu ribózového zbytku cytokininu. Mezi cytokininy schopné tvořit *O*-glukosidy se řadí zeatin, dihydrozeatin, topolin nebo hydroxylované deriváty fenyльмоčoviny (Brzobohatý *et al.*, 1993; Mok and Mok, 2001).

Pomocí procesu *N*-glykosylace vznikají *N*-glukosidy, které se mohou vázat na atomech dusíku v pozici *N3*-, *N7*-, *N9*- purinového kruhu. *N*-glukokonjugáty v pozici *N7*- a *N9*- nejsou štěpeny pomocí enzymu β -glukosidázy, a tudíž mají velmi nízkou nebo žádnou biologickou aktivitu. *N*-glykosylace je v tomto případě v podstatě nevratná (ireverzibilní) a jedná se o tzv. inaktivované formy cytokininů (Letham *et al.*, 1973; Mok and Mok, 2001). Naproti tomu v pozici *N3*- může za katalýzy β -glukosidázy docházet k přeměně glukosidů na volné báze (Brzobohatý *et al.*, 1993).

Mezi další cytokininy patří i cytokininy s aromatickým postranním řetězcem, kam se řadí kinetin (K), 6-benzyladenin (BA) a jeho hydroxylované deriváty *meta*-, *ortho*- a *para*-. Na základě jejich objevu v listech topolu byla tato skupina pojmenována topoliny (Strnad *et al.*, 1977) a na základě jejich chemické struktury se řadí mezi aromatické cytokininy spolu s jejich methoxyderiváty (Strnad *et al.*, 1993).

Obecná struktura cytokininů	R ₁	R ₃	Sloučenina	Zkratka
	H	-	<i>N</i> -isopentenyladenine	iP
	N ₉ -R	-	<i>N</i> ^β -isopentenyladenosine	iPR
	N ₇ -G	-	<i>N</i> ^β -isopentenyladenine-7-glucoside	iP7G
	N ₉ -G	-	<i>N</i> ^β -isopentenyladenine-9-glucoside	iP9G
	N ₉ -RP	-	<i>N</i> ^β -isopentenyladenosine-5'-monophosphate	iPMP
	H	H	<i>trans</i> -zeatin	tZ
	N ₉ -R	H	<i>trans</i> -zeatin riboside	tZR
	N ₇ -G	H	<i>trans</i> -zeatin-7-glucoside	tZ7G
	N ₉ -G	H	<i>trans</i> -zeatin-9-glucoside	tZ9G
	H	G	<i>trans</i> -zeatin <i>O</i> -glucoside	tZOG
	N ₉ -R	G	<i>trans</i> -zeatin riboside <i>O</i> -glucoside	tZROG
	N ₉ -RP	H	<i>trans</i> -zeatin riboside-5'-monophosphate	tZMP
	H	H	<i>cis</i> -zeatin	cZ
	R	H	<i>cis</i> -zeatin riboside	cZR
	N ₉ -G	H	<i>cis</i> -zeatin-9-glucoside	cZ9G
	H	G	<i>cis</i> -zeatin <i>O</i> -glucoside	cZOG
	N ₉ -R	G	<i>cis</i> -zeatin riboside <i>O</i> -glucoside	cZROG
N ₉ -RP	H	<i>cis</i> -zeatin riboside-5'-monophosphate	cZMP	
	H	H	dihydrozeatin	DHZ
	N ₉ -R	H	dihydrozeatin riboside	DHZR
	N ₉ -G	H	dihydrozeatin-9-glucoside	DHZ9G
	H	G	dihydrozeatin <i>O</i> -glucoside	DHZOG
	N ₉ -R	G	dihydrozeatin riboside <i>O</i> -glucoside	DHZROG
N ₉ -RP	H	dihydrozeatin riboside-5'-monophosphate	DHZMP	
	H	-	<i>N</i> ^β -benzyladenine	BA
	N ₉ -R	-	<i>N</i> ^β -benzyladenosine	BAR
	N ₃ -G	-	<i>N</i> ^β -benzyladenine-3-glucoside	BA3G
	N ₇ -G	-	<i>N</i> ^β -benzyladenine-7-glucoside	BA7G
	N ₉ -G	-	<i>N</i> ^β -benzyladenine-9-glucoside	BA9G
N ₉ -RP	-	<i>N</i> ^β -benzyladenosine-5'-monophosphate	BAMP	
	H	-	<i>ortho</i> -topolin	oT
	N ₉ -R	-	<i>ortho</i> -topolin riboside	oTR
	N ₉ -G	-	<i>ortho</i> -topolin-9-glucoside	oT9G
	H	-	<i>meta</i> -topolin	mT
	N ₉ -R	-	<i>meta</i> -topolin riboside	mTR
	N ₉ -G	-	<i>meta</i> -topolin-9-glucoside	mT9G
	H	-	<i>para</i> -topolin	pT
	N ₉ -R	-	<i>para</i> -topolin riboside	pTR
	H	-	kinetin	K
	N ₉ -R	-	kinetin riboside	KR
	N ₉ -G	-	kinetin-9-glucoside	K9G

Obr. 1: Seznam a struktura isoprenoidních a aromatických cytokininů a jejich metabolitů (převzato a upraveno podle Svačinová *et al.*, 2012)

H = vodík, R = β -D-ribofuranosyl, G = β -D-glukopyranosyl, RP = β -D-ribofuranosyl-5'-monofosfát

2.4 Biosyntéza cytokininů

Hlavní částí rostliny, kde probíhá biosyntéza cytokininů, jsou kořeny. Cytokinininy jsou rozváděny z kořenů do nadzemních částí rostlin pomocí xylému. Za určitých podmínek může docházet k tomu, že některé rostlinné části začnou produkovat cytokinininy samovolně a stávají se tak autonomními. Místo s nejvyšší hladinou cytokininů nalezneme v intenzivně se dělicích a rostoucích pletivech. Koncentrace jednotlivých cytokininů může být ovlivněna i dalšími rostlinnými hormony, jako např. vyšší hladinou auxinů či ethylenu, které jsou zodpovědné za potlačení akumulace tohoto typu fytohormonů (Procházka, 1998). Hladina cytokininů se mění v průběhu jednotlivých fází buněčného cyklu, při různých vývojových stádiích či na reakcích na podněty z vnějšího prostředí. Příkladem může být G2 nebo M fáze buněčného cyklu, kdy dochází k přechodnému zvyšování hladin cytokininů v rostlinách (Redig *et al.*, 1996).

Kvůli nehybné povaze rostlinného těla, mimo tropismů, vyžadují rostliny vysoce účinné mechanismy pro aklimatizaci na měnící se podmínky prostředí a pro komunikaci mezi jednotlivými orgány těla rostliny. Kromě různých specifických fytohormonů využívají rostliny i klasické hormony, jako např. steroidy, oligopeptidy, či sloučeniny podobné eikosanoidům (Cedzich *et al.*, 2008).

Pro biosyntézu isoprenoidních cytokininů existují dvě metabolické dráhy. První je spojena s degradací tRNA (nepřímá) a druhá dráha je spojena s isopentenylací volných nukleotidů adeninu (přímá), kdy dochází k přenosu isopentenylové skupiny z dimethylallylpyrofosfátu (DMAPP) nebo hydroxymethylbutenyldifosfátu (HMBDP) na *N*6- adenosindifosfát (ADP) nebo adenosintrifosfát (ATP). Poprvé byla tato dráha objevena u *Dictyostelium discoideum* (Taya *et al.*, 1978), která produkuje discadenin sloužící jako inhibitor klíčení spor (Nomura and Tanaka, 1977). Přímá biosyntéza probíhá dvěma základními dráhami. Jedná se o dráhu mevalonátovou (MVA), která se odehrává v cytosolu eukaryot (Lichtenthaler, 1999; Rohmer, 1999) nebo dráhu methylerythritol fosfátovou (MEP), která je lokalizována v bakteriích a plastidech (Sakakibara, 2006).

Za začátek biosyntézy u isoprenoidních cytokininů je považována prenylace *N*6-aminoskupiny volných adenosinových nukleotidů (AMP, ADP nebo ATP) nebo prenylace adenosinfosfátu vázaného na tRNA. Reakce jsou katalyzovány dvěma různými třídami dimethylallyltransferáz, známé jako isopentenyltransferázy (IPT). První třídou je adenylátová IPT (EC 2.5.1.27) katalyzující přenos isopentenylové skupiny na AMP a adenylátová IPT (EC 2.5.1.112) katalyzující přenos isopentenylové skupiny na ADP/ATP (Takei *et al.*, 2001; Kakimoto, 2001). Obě IPT získávají isopentenylovou skupiny z DMAPP podílející se na tvorbě iP. Druhou třídou je tRNA IPT (EC 2.5.1.75) katalyzující přenos isopentenylové skupiny na adenosinfosfát. (Persson *et al.*, 1993).

Isopentenyladenin ribosid-5'-mono-, di- a trifosfát (iPR5'MP, iPR5'DP, iPR5'TP) jsou katalyzovány pomocí adenylátových IPT a může docházet k jejich hydrolýze za vzniku příslušných nukleotidů *tZ* za účinku monooxygenázy cytochromu P450 (Frébertová *et al.*, 2021). Vzniklé ribosid- 5'-monofosfáty z tRNA degradace nebo produkcí adenylátových IPT mohou být přeměněny na

volné báze za pomoci specifického enzymu fosforibohydroxylázy (EC 3.2.2.n1) (Kurakawa *et al.*, 2007). Tento enzym je též znám pod názvem „osamělý chlap“ („lonely guy“ - LOG). Mimo jiné se tento enzym podílí na transformaci *trans*- a *cis*ZR5'MP na příslušné volné báze.

Isopentenyladenin ribosid (iPR), vázán na tRNA, může podléhat modifikaci pomocí enzymu tRNA 2-methylthio-*N*6-dimethylallyladenosin syntázy (EC 2.8.4.3) (Esberg *et al.*, 1999) a tRNA 2-methylthio-*N*6-isopentenyladenosin hydroxylázy (EC 1.14.99.69) (Persson *et al.*, 1993). Za výsledek této reakce je považován vznik tRNA 2-methylthio iPR (2MeSiPR), *cis*-zeatin ribosidu (*c*ZR) a tRNA 2-methylthio-*cis*-zeatin ribosidu (2MeScZR) (Frébortová *et al.*, 2021).

Na přeměně nukleotidů na ribosidy a báze se podílí nejen enzym LOG, ale i další enzymy běžného metabolismu purinů – fosfatázy, nukleotidázy, nukleosidázy, kinázy a fosforibosyltransferázy (Frébortová *et al.*, 2021).

U *Arabidopsis thaliana* bylo identifikováno 7 *IPT* genů (*AtIPT1*, *AtIPT3-AtIPT8*) podílejících se na biosyntéze cytokininů (Kakimoto, 2001; Takei *et al.*, 2001; Sun *et al.*, 2003) a exprimovaných v celé řadě rostlinných orgánů a typů buněk (Miyawaki *et al.*, 2004; Takei *et al.*, 2004a). Produkty těchto genů, jako např. isopentylát ATP a ADP (Kakimoto, 2001; Sakakibara 2006), reprezentují většinu cytokininů iP a *tZ* typu (Miyawaki *et al.*, 2006). Právě nízká afinita *AtIPT* k AMP naznačuje, že většina přirozeného iPR5'MP je tvořena defosforylací iPR5'DP a iPR5'TP nebo fosforylací isopentenyladenin ribosidu (iPR) pomocí adenosinkinázy nebo konjugací fosforibosylového zbytku (Mok a Mok, 2001). Jako jedna z cest pro získávání cytokininů byla navržena degradace isopentylované tRNA. U *Arabidopsis* se vyskytují dva geny, *tRNA-IPT*, *AtIPT2* a *AtIPT9*, které katalyzují isopentylaci tRNA a též jsou velmi důležité pro syntézu cytokininů *cZ*-typu (Golovko *et al.*, 2002; Miyawaki *et al.*, 2006).

První charakterizace *IPT* genu byly provedeny v *Agrobacterium tumefaciens* (Akiyoshi *et al.* 1984; Barry *et al.* 1984), u které se vyskytují dva *IPT* geny – *Tmr* a *Tzs*. Gen *Tmr* je kódován v T-DNA plazmidu Ti a gen *Tzs* se nachází v oblasti virulence Ti-plazmidu nopalinového typu, jehož hlavní rolí je posílit účinnost přenosu T-DNA (John a Amasino, 1988; Powell *et al.*, 1988). Gen *Tmr* je integrován do jaderného genomu hostitele, kdežto gen *Tzs* působí v bakteriálních buňkách. Oba geny používají jako substrát výhradně AMP, nikoli jiné adenosinfosfáty.

Reakční dráha iPR5'MP ve vyšších rostlinách se pravděpodobně podobá té, která se vyskytuje u *D. discoideum* a *A. tumefaciens* (Sakakibara, 2006). *IPT* geny byly dále identifikovány jak u *Arabidopsis* (Kakimoto, 2001; Takei *et al.*, 2001), tak i u dalších rostlin jako např. u petúnie (Zubko *et al.*, 2002) moruše (Abe *et al.*, 2007), kukuřice (Brugière *et al.*, 2008), rýže (Sakamoto *et al.*, 2006) nebo chmele (Sakano *et al.* 2004).

HMBDP je produktem methylerythritolfosfátové (MEP) dráhy, kdežto DMAPP je syntetizován jak MEP dráhou, tak i dráhou MVA. Pokud je substrátem pro biosyntézu DMAPP, jako primární produkt vzniká iP nukleotid. Přímým působením *IPT* na HMBDP poté vzniká *tZ* nukleotid. Dříve než byla objevena MEP dráha, byla MVA považována za jedinou známou dráhu produkující isoprenoidní prekurzory DMAPP a isopentenyldifosfát ve vyšších rostlinách (Sakakibara, 2006). Akumulace

cytokininů je výrazně snižována inhibitorem MVA dráhy – lovastinem (Laureys *et al.*, 1998; Laureys *et al.*, 1999). Tento proces potvrzuje myšlenku, že MVA dráha je zdrojem isoprenoidních postranních řetězců.

Hydroxylace isopentenyladeninového typu je klíčová pro biosyntézu *tZ*. Enzym katalyzující tuto reakci nebyl doposud identifikován, známé jsou pouze monooxygenázy cytochromu P450 – CYP735A1 a CYP735A2, které se podílejí na biosyntéze *tZ*. Oba tyto enzymy cytochromu P450 využívaly v *in vitro* podmínkách spíše isopentenyladeninové nukleotidy než nukleosidové formy a volné báze. Na základě toho docházelo k produkci nukleotidů *tZ*-typu a ne k produkci *cis*-izomerů (Takei *et al.*, 2004b).

2.5 Metabolismus cytokininů

Cytokiny jsou metabolizovány modifikací purinové skupiny, úpravami na *N6*- postranním řetězci, popřípadě přeměnou v živých organismech. Strukturální změny mohou vést k reverzibilní či ireverzibilní ztrátě biologické aktivity a zároveň určují funkci a uspořádání odpovídajícího metabolitu cytokininu (Spíchal *et al.*, 2012). Na přeměně adenosinového skeletu se podílejí enzymy se širokou substrátovou specifiitou a schopností rozeznávat adenosin. Příkladem těchto enzymů je 5'-nukleotidáza (EC 3.1.3.5), adeninfosforibosyltransferáza (EC 2.4.2.7) a adenosinkináza (ADK, EC 2.7.1.20), které byly objeveny u různých rostlinných druhů (Mok and Mok, 2001). Adenosinkináza (ADK) patří mezi jeden z klíčových enzymů v regulaci hladiny adenosinu a je zodpovědná za převod cytokininových ribosidů na příslušné nukleotidy (Kwade *et al.*, 2005). V roce 2007 byl objeven enzym LOG, který se mimo jiné účastní biosyntézy cytokininů a značně se podílí i na metabolismu cytokininů (Kurakawa *et al.*, 2007). Tento enzym je zodpovědný za převádění neaktivních cytokininových nukleotidů na volné báze a jeho důležitá role pro metabolismus byla potvrzena u *Arabidopsis thaliana* (Kuroha *et al.*, 2009; Tokunaga *et al.*, 2012).

2.5.1 Glykosylace

Cytokiny se mohou v rostlinách vyskytovat ve formě volných bází nebo jako odpovídající nukleosidy či nukleotidy. Během metabolismu cytokininů dochází ke konjugaci cytokininů, což zahrnuje procesy jako např. *O*-xylosylaci, *O*-glukosylaci nebo *N*-glykosylaci (Mok *et al.*, 2000; Martin *et al.*, 2001; Letham *et al.*, 1979; Veach *et al.*, 2003).

Glykosylace byla pozorována jako modifikace v polohách *N3*-, *N7*- a *N9*- purinového kruhu. Enzymem zodpovědným za *N*-glykosylaci probíhající na atomech dusíku v pozici *N7*- nebo *N9*- purinového kruhu je glukosyltransferáza (EC 2.4.1.118) (Entsch *et al.*, 1979). Jako donory glukosylu

tento enzym používá uridin difosfát glukózu (UDPG) a uridin trifosfát glukózu (UTPG) (Hošek *et al.*, 2020; Spíchal, 2012). Zvláštní metabolickou skupinou jsou *N*3-glukosidy, které nevykazují aktivitu při biologických testech a předpokládá se, že glykosylace v pozicích *N*7- a *N*9- je zodpovědná za nevratnou inaktivaci cytokininů (Kieber a Schaller, 2018) *N*9-glukosidy jsou považovány za preferované substráty některých izoform cytočininoxidázy/dehydrogenázy (CKX, EC 1.5.99.12) (Galuszka *et al.*, 2007; Kowalska *et al.*, 2010). V případě *N*3-glukosidů dochází k výjimce, při které je tento glukosid přeměněn na volnou bázi za pomoci β -glukosidázy (EC 3.2.1.21) (Brzobohatý *et al.*, 1993).

U *Arabidopsis* byly identifikovány dva enzymy – UGT76C1 (UDP-glukosyltransferáza 76C1) a UGT76C2 (N-glukosyltransferáza), které glykosylují celou řadu cytokininů jako např. *tZ*, *cZ*, DHZ, *iP*, BA i kinetin (Hou *et al.*, 2004). Tyto enzymy upřednostňují glykosylaci v polohách *N*7- před *N*9- (Wang *et al.*, 2011), což zodpovídá za rozdílnou koncentraci cytočininových *N*-glukosylátů v jednotlivých částech *Arabidopsis* (Sakakibara *et al.*, 2005) a odpovídá to majoritnímu výskytu *N*7-glukosidů.

O-glykosylace cytočininů představuje reverzibilní krok, který vede k jejich rychlé deaktivaci díky odstranění *O*-glukosylové skupiny pomocí β -glukosidázy (EC 3.2.1.21) (Brzobohatý *et al.*, 1993). Je katalyzována pomocí *O*-glukosyltransferáz, které rozpoznávají *tZ*, *cZ*, nebo DHZ (Záveská *et al.*, 2021), ale nemají žádnou aktivitu vůči např. ribosidům (Dixon *et al.*, 1989; Turner *et al.*, 1987). Pro průběh této reakce je důležitá přítomnost hydroxylové skupiny na postranním řetězci. Enzymy zodpovědnými za *O*-glukosylaci jsou zeatin *O*-glukosyltransferáza (ZOG, EC 2.4.1.203) (Dixon *et al.*, 1989) získaná z embryí fazole měsíční (*P. lunatus*) a zeatin *O*-xylosyltransferáza (ZOXT, EC 2.4.2.40) (Turner *et al.*, 1987) získaná z embryí fazole obecné (*P. vulgaris*). Jako donory ZOG využívá UDPG i uridindifosfátxyulózu (UDPX), kdežto *O*-xylosyltransferáza využívá pouze UDPX. Obě tyto transferázy rozpoznávají substráty cytočininů vysoce specifickým způsobem. Jako substráty slouží pouze *trans*-izomer zeatinu nebo parciální dihydrozeatin (Spíchal, 2012). Díky přísné substrátové specifitě se dá říct, že *O*-glykosylace je velmi přesně regulovatelný proces a chrání cytočininy před štěpením postranního řetězce cytočininoxidázou/dehydrogenázou (CKX) (Armstrong, 1994; Kudo *et al.*, 2010). Jediným donorem cukerné složky je v tomto případě UDPG (Martin *et al.*, 2001). *O*-glykosylované cytočininy lze velmi jednoduše přeměnit na aktivní formu cytočininů, a to za pomoci β -glukosidáz (Brzobohatý *et al.*, 1993). *O*-glukosidy představují sice neaktivní, ale stabilní skladovací formy cytočininů (Mok and Mok. 2001).

2.5.2 Postranní řetězec a jeho modifikace

Klíčovou metabolickou regulací u některých organismů se stalo nevratné štěpení postranního řetězce *N*6-, které může mít významný vliv na aktivitu cytočininů. Postranní řetězec jednoho z isoprenoidních cytočininů, konkrétně *trans*-zeatinu, může být redukován za vzniku dihydrozeatinu,

konjugovaného s *O*-glukosidy nebo může být převeden na *cis*-zeatin či štěpen za pomoci CKX (Nogué et al., 2003)

Identifikovaný enzym byl označen jako cytokininoxidáza (CKX), která byla poprvé klonována z jader kukuřice seté - *Zea Mays* (Houba-Hérin et al., 1999; Morriss et al., 1999). Akceptorem elektronů u tohoto enzymu byl atom kyslíku (Whitty a Hall, 1974; Hare a Van Staden, 1994). Z-typy (*tZ*, *cZ*) a iP-typy cytokininů obsahují nenasycený N6- postranní řetězec, který může podléhat štěpení za přítomnosti CKX, naproti tomu DHZ, BA a K jsou vůči tomuto štěpení odolné. Za výhodné substráty, které podléhají štěpení CKX mohou být považovány volné báze a jejich ribosidy. Další substituce funkčních skupin na purinovém kruhu zabráňují štěpení cytokininoxidázou/dehydrogenázou, podobně jako je tomu u *N*- a *O*-glykosylace (Schmülling et al., 2003; Werner et al., 2006).

Zeatin reduktáza (EC 1.3.1.69) je vysoce specifický enzym podílející se na přeměně *trans*-zeatinu na dihydrozeatin za přítomnosti kofaktoru nikotinadenindinukleotidfosfátu (NADPH). Na redukci *cZ*, *tZR*, iP, nebo zeatin *O*-glukosidů se tento enzym nepodílí. Zeatin reduktáza byla izolována ze semen fazole obecné (*Phaseolus vulgaris*) (Martin et al., 1989). Díky rezistenci DHZ proti cytokininoxidázám, hraje zeatin reduktáza významnou roli v homeostázi cytokininů.

Další důležitý gen podílející se na metabolismu cytokininů byl izolován z kukuřice a kóduje enzym *cis*-zeatin *O*-glukosyltransferázu (*cis*ZOG), který není schopen rozpoznávat DHZ či *tZ*. Významným modifikačním enzymem identifikovaným ve fazoli (*Phaseolus*) (Bassil et al., 1993) je enzym specifický pro *cis*-zeatin, a to *cis-trans*-zeatin izomeráza. Úkolem toho enzymu je převod *cis*-izomeru na *trans*- izomer. Jeho významná role se projevuje při regulaci cytokininové aktivity, jelikož převádí méně aktivní *cis*-zeatin na vysoce aktivní *trans*-zeatin. Pro správnou funkci této izomerázy je důležitá přítomnost flavinadenindinukleotidu (FAD) nebo flavinmononukleotidu (FMN), dithiothreitolu či vlivu světla. Tato reakce může probíhat i bez přítomnosti této izomerázy, ale průběh je však značně zpomalen (Nogué et al., 2003).

2.5.3 Degradace cytokininů

Degradace je jedním z klíčových procesů v metabolické dráze, která udržuje hladiny cytokininových metabolitů a zároveň je zodpovědná za jejich distribuci v rostlinných systémech. Regulace degradace cytokininů je částečně závislá i na dalších metabolických přeměnách, jimž molekuly podléhají a na substrátové specifitě CKX (Armstrong, 1994). Za kompletní a nevratnou inaktivaci cytokininů je zodpovědný enzym cytokininoxidáza/dehydrogenáza (CKX), která zároveň hraje důležitou roli při regulaci nebo omezení účinku cytokininů. Jedná se o flavoprotein s kovalentně vázanou molekulou FAD, který oxidativně štěpí N6- postranní řetězec cytokininů (Galuszka et al., 2001). Oxidativním štěpením se vytváří adenin a odpovídající nenasycený aldehyd odvozený od postranního řetězce (Frébertová et al., 2004; Brownlee et al., 1975; Galuszka et al., 2001).

Aktivita enzymu CKX byla poprvé identifikována v roce 1971 v tkáni tabáku (Pačes *et al.*, 1971). Následně byl enzym CKX izolován i z mnoha dalších rostlinných druhů (Galuszka *et al.*, 2000) a u některých nižších organismů, např. u mechu - *Funaria hydrometrica* (Gerhauser a Bopp, 1990), slizu - *D. discoideum* (Armstrong a Firtel, 1989) a kvasinek - *Saccaromyces cerevisiae* (Van Kast a Laten, 1987). Ovšem výskyt v těchto organismech není zatím zcela potvrzen (Schmüling *et al.*, 2003). Vyšší koncentrace CKX se nachází v kořenech oproti jiným rostlinným orgánům, např. ve výhoncích rostlin (Jones and Schreiber, 1997). Ovšem nejlepším zdrojem jsou semena rostlin (Galuszka *et al.*, 2001; Jones *et al.*, 1992).

U *Arabidopsis thaliana* bylo identifikováno 7 navzájem se lišících genů pro cytokinioxidázu/dehydrogenázu (*AtCKX1-AtCKX7*) (Schmüling *et al.*, 2003). Každý z těchto 7 genů je exprimován na odlišných místech rostlinného těla, v různých vývojových stádiích a v odlišných rostlinných pletivech (Werner *et al.*, 2003). Geny *AtCKX2*, *AtCKX4*, *AtCKX5* a *AtCKX6* jsou pravděpodobně cíleny na sekreční dráhu rostlin, což bylo ověřeno lokalizací *AtCKX2-GFP* (Werner *et al.*, 2003). Tyto geny jsou většinou lokalizovány v apoplastu. *AtCKX1* a *AtCKX3-GFP* jsou zacíleny na vakuoly, kdežto *AtCKX7* nemá žádnou cílovou sekvenci a s největší pravděpodobností se vyskytuje v cytosolu (Werner *et al.*, 2003), což je v korelaci s intracelulární expresí rekombinantního proteinu v *E. coli* a *Pichia pastoris* (Kowalska *et al.*, 2010). Díky hydrofobnímu N-terminálnímu signálnímu peptidu, jsou jednotlivé geny zacíleny do uvedených částí rostlin, tedy do apoplastu a vakuol. Geny *AtCKX1* a *AtCKX2* jsou lokalizovány na chromozomu 2, geny *AtCKX3* a *AtCKX7* na chromozomu 5, *AtCKX4* na chromozomu 4, *AtCKX5* na chromozomu 1 a *AtCKX6* na 3 chromozomu. Všechny uvedené proteiny se podobají svojí velikostí (60 kDa), ale naopak se liší v aminokyselinové identitě, která se pohybuje mezi 34,3% (*AtCKX4* a *AtCKX7*) a 65,9% (*AtCKX2* a *AtCKX4*). Rozdílnost v aminokyselinových sekvencích přispívá k různorodosti izoenzymů *AtCKX* (Frébort *et al.*, 2011).

2.6 Transportní cesty cytokininů

Cytokinininy jsou transportovány napříč rostlinnými buňkami, a to i na dlouhé vzdálenosti od místa jejich syntézy směrem k cílovým buňkám za účelem přenosu signálu. Důsledkem přenosu cytokininů na dlouhé vzdálenosti je nerovnoměrná distribuce jednotlivých druhů cytokininů ve floému a xylému. Podle prováděných analýz se cytokinininy *trans*-zeatinového typu vyskytují s vyšší frekvencí v xylému, a naopak cytokinininy *iP*-typu byly detekovány spíše ve floému (Hirose *et al.*, 2008; Matsumoto-Kitano *et al.*, 2008). Příčinou této nerovnoměrné distribuce cytokininů je exprese *CYP735A* v kořenech rostliny. Tato cytochrom monooxygenáza hydroxyluje cytokinininy *iP*-typu na cytokinininy *tZ*-typu (Takei *et al.*, 2004b).

Existují dvě cesty transportu bazipetální a akropetální. Bazipetální je charakteristická pro transport cytokininů *iP*-typu syntetizovaných ve výhoncích rostlin, tedy prostřednictvím floému.

Naopak akropetální cesta je charakteristická pro cytokininy *tZ*-typu transportovaných z kořenů prostřednictvím xylémové mízy (Hirose *et al.*, 2008; Osugi *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2014).

Identifikace prvních genů zapojených do cytokininové signalizace trvala více než 40 let. Prvním identifikovaným mutantem u *Arabidopsis thaliana* byl CYTOKININ INDEPENDANT 1 (CKI1) (Kakimoto, 1996). Objevený CKI1, kódující integrální membránový protein, který se podobá bakteriálním dvousložkovým histidin-kinázám, je odpovědný za jedno z prvních vnímání signalizace cytokininů (Yamada, 2001). Za jako první objevený cytokininový receptor se označuje CYTOKININ RESPONSE 1 (CRE1) (Inoue *et al.*, 2001) získaný pomocí screeningu mutantů *Arabidopsis*.

Známé jsou tři druhy cytokininových transportérů – purinové permeázy (PUP), ekvilibrační nukleosidové transportéry (ENT) a transportéry „ATP-binding cassette“ podskupiny G (ABCG) (Borgi *et al.*, 2015; Girke *et al.*, 2014; Kudo *et al.*, 2010).

Prvním identifikovaným PUP transportérem byl PUP1. Zjistilo se, že kromě schopnosti transportovat adenin může PUP1 transportovat např. kinetin nebo zeatin a v menší míře i jejich ribosidy (Gillissen *et al.*, 2000). Postupně byla identifikována celá nová rodina těchto membránových proteinů o 21 členech (Schwacke *et al.*, 2003). Dalšími významným členem je PUP2, který je schopný transportovat obsáhlé spektrum cytokininů – *tZ* a *cZ*, *iP*K, BA a v menší míře i *tZR* (Bürkle *et al.*, 2003).

U *Arabidopsis thaliana* bylo identifikováno 5 proteinů patřících mezi nespecifické transportéry (AtENT1, AtENT3, AtENT4, AtENT6 a AtENT7). Tyto proteiny vykazují širokou substrátovou specifitu a transportují purinové nukleosidy (adenosin a guanosin) a pyrimidinové nukleosidy (cytidin a uridin). Transport může být inhibován deoxynukleosidy a z části i nukleobázemi (Möhlmann *et al.*, 2001; Wormit *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2003). Transportní proteiny AtENT3, AtENT6 a AtENT7 se mimo jiné účastní i transportu cytokininových ribosidů. Pro *iPR* vykazují tyto proteiny vyšší afinitu než pro *tZR* (Hirose *et al.*, 2007; Sun *et al.*, 2005).

2.7 Signální transdukce cytokininů a jejich receptory

U mikroorganismů je známo, že využívají tzv. dvousložkový systém (TCS – „two component systém“) pro změnu exprese genů, aby reagovaly na různé podněty a zlepšily svoji schopnost vnímat prostředí a adaptovat se na něj (Stock *et al.*, 2000; Gao a Stock, 2009; Cheung a Hendrickson, 2010).

Dvousložkový systém se skládá ze dvou proteinů – histidinkinázy (HK) spojený s membránou a regulátorem odezvy (RR) lokalizovaným v cytoplazmě. Jednotlivé histidinkinázy hrají roli při detekci signálu v oblasti senzoru a následně přenáší daný signál dále do cytoplazmy (Appleby *et al.*, 1996; Cheung a Hendrickson, 2010). Rostliny si vyvinuly podobný, ale vícestupňový fosforylační systém, který je složen z histidinkinázy, histidinfosfotransferových proteinů (HP) a regulátorů odezvy (RR) (Grefen a Harter, 2004). V průběhu vícestupňového fosforylačního systému dochází ke kontinuálním fosforylačním dějům, které se průběžně střídají mezi histidinovými a aspartátovými zbytky (Hwang *et*

al., 2012). Vícestupňový fosforylační systém je využíván právě cytokinininy pro jejich signální transdukci, také za účasti na buněčném dělení, stárnutí listů a apikální dominanci (Pils a Heyl, 2009). Dále je fosforylační systém rostlinou využíván k přenosu stresových signálů právě prostřednictvím cytokininů (Mochida *et al.*, 2010).

Vazba cytokininu na příslušný receptor je zodpovědná za konformační změnu, která způsobí autofosforylaci konzervovaného histidinového zbytku umístěného v cytosolové části příslušného receptoru. Signál pokračuje přes kanonický aspartát v C-terminální části proteinu a následně je transdukován přes vícekrokový dvousložkový signalizační systém (Ferreira and Kieber, 2005; Mizuno, 2005). Receptory cytokininů patří mezi katalytické receptory se složitou vícedoménovou strukturou.

Podle nedávných zjištění bylo objeveno, že histidinkinázy obsahují takzvanou CHASE doménu („Cyclases/Histidine kinases Associated Sensory Extracellular“) lokalizovanou na N-konci molekuly receptoru. Schopností této domény je vázání ligandů s nízkou molekulovou hmotností. CHASE doména se přibližně skládá asi z 250 aminokyselin a na povrchu jsou 4 specifické aminokyseliny rozhodující o vazbě příslušného ligandu (Heyl *et al.*, 2007). Výskyt této domény není omezen pouze na suchozemské rostliny, ale může se objevovat i u jiných eukaryot (houby či améby), či prokaryot, jako jsou rostlinné patogeny a sinice (Kabbara *et al.*, 2018).

Prvním identifikovaným cytokininovým receptorem u *Arabidopsis* byl CRE1/AHK4, který je považován za senzory histidinkinázu (Suzuki *et al.*, 2001b; Inoue *et al.*, 2001). Schopnost identifikovaných receptorů rozpoznat hormonální signál byla potvrzena v průběhu experimentů s transformovanými bakteriemi a kvasinkami. Důležitá role těchto proteinů, jako receptorů, byla ověřena pomocí studia mutantů s vloženými inzerty v *Arabidopsis*. Obecně platnou podmínkou je, že mutace v jednom receptoru nezpůsobuje žádné znatelné změny, naopak mutace dvou a více receptorů má již závažné účinky. Pokud dojde k mutaci ve všech třech receptorech tedy k jejich inaktivaci, důsledkem je necitlivost k cytokininům a vývoj zakrslé rostliny se sníženou životaschopností (Riefler *et al.*, 2006; Higuchi *et al.*, 2004; Nishimura *et al.*, 2004). Známý receptor CRE1/AHK4 je především exprimován v kořenech, kdežto například AHK3 je exprimován v listech. S tím souvisí účinky cytokininů na nadzemní a podzemní části rostlin (Romanov, 2009).

2.8 Hlavní fyziologické účinky cytokininů

Cytokinininy hrají klíčovou roli v mnoha aspektech růstu a vývoje rostlin. Účinky exogenně aplikovaných cytokininů poukazují na jejich významnou úlohu v hormonálních regulacích u různých fyziologických procesů. Hlavními procesy, které jsou ovlivňovány cytokinininy, jsou funkce v meristémové aktivitě výhonků a kořenů, při větvení výhonků a kořenů, v regulaci velikosti orgánů a ve vývojových přechodech (kvetení a klíčení), v kontrole stárnutí listů, mobilizaci živin, apikální dominanci a další (Kieber a Schaller, 2018; Werner a Schmölling, 2009). V souvislosti s cytokinininy byly zaznamenány i jejich funkce v obraně proti stresu zvyšováním odolnosti vůči nepříznivým podmínkám prostředí (Skoog a Armstrong, 1970). Dále tyto fytohormony zprostředkovávají mnoho procesů regulovaných světlem, včetně diferenciaci chloroplastů, metabolismus listů a děložní expanze listů (Mukherjee *et al.*, 2022).

2.8.1 Buněčné dělení

Jedním z hlavních účinků cytokininů je stimulace buněčného dělení. V meristematických intenzivně se dělících pletivech se vyskytují vysoké koncentrace cytokininů v aktivní formě (Procházka, 1998). Cytokinininy rovněž ovlivňují některé reakce v buněčném cyklu, například mohou stimulovat funkci jednotlivých kináz podílejících se na regulaci buněčného dělení (Shaller *et al.*, 2014). Dalším významným faktorem je vliv na replikaci DNA, konkrétně na S fázi mitózy, kde zvyšují počet počátků a zkracují replikony urychlující její přepis DNA. U vyvíjejících se rostlin hrají tyto fytohormony klíčovou regulační roli v meristéměch (Shaller *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2021). Pozitivně regulují SAM (apikální meristémy výhonků) přes stimulaci buněčného dělení, a naopak negativně regulují kořenový apikální meristém (RAM) tím, že podporují diferenciaci buněk (Shaller *et al.*, 2014)

2.8.2 Regulace buněčného dělení

Regulace buněčného cyklu je v mnoha aspektech podobná regulaci živočišných buněk. U rostlin jsou využívány proteiny, jako např. cykliny, cyklindependentní kinázy (CDK), CDK-aktivující kinázy (CAK), CDK inhibitory (CKI), proteiny související s retinoblastomem (RBR) a transkripční faktory E2F (Francis, 2007). Cytokinininy jsou zde malými proteiny schopnými inhibice aktivity CDK a jsou funkčně spojovány s regulací rostlinného buněčného cyklu (Cheng *et al.*, 2013; Veylder *et al.*, 2001). Všechny přechody v buněčném cyklu rostlin jsou stejně jako u eukaryot řízeny regulací aktivity CDK. U *Arabidopsis* jsou CDK rozděleny do 8 skupin (Gutierrez, 2009). CDKA je esenciální gen, který je důležitý při přechodech G1/S a G2/M. Jednotliví zástupci CDKB začínají být exprimováni v pozdní S fázi a exprimace pokračuje až do M fáze, kde dochází k vyvrcholení kinázové aktivity v mitóze. CDKD a CDKF působí podobně jako CAK. U cyklindependentních kináz C a E nebyla prokázána

spojitost s buněčným cyklem. U *Arabidopsis* nacházíme přes 50 cyklinových genů a až 30 z nich má spojitost s buněčným cyklem (Gutierrez, 2009). Cykliny typu A a B se řadí mezi mitotické cykliny a interagují s CDKA a někdy i CDKB proteiny. Cykliny typu D se podílejí při přechodu G1/S. Cytokininy mají roli při řízení jak přechodu G1/S, tak G2/M v buněčném cyklu (Shaller *et al.*, 2014).

Při zkoumání hladin cytokininů během buněčného cyklu u buněčné kultury BY-2 byl odhalen velmi výrazný krátkodobý nárůst těchto hladin. Nejvýraznější chování bylo zaznamenáno u cytokininů zeatinového typu, kdy jejich vrcholové koncentrace byly pozorovány v časně G1, pozdní G a až do časně, střední (Dobrev *et al.*, 2002) nebo i pozdní S-fáze (Redig *et al.*, 1996), též i v G2/M přechodu a vstupu do mitózy (Hartig a Beck, 2005). Naopak méně výrazné byly píky u cytokininů dihydrozeatinového typu, které byly pozorovány v G1 a pozdní G fázi až do časně S fáze ale i v G/M přechodu. Je známá i studie (Dobrev *et al.*, 2002), kde byly zaznamenány i vrcholy cytokininu iP-typu a to v časně S fázi, *O*-glukosidy Z-typu v G2/M přechodu. Z těchto získaných poznatků, že hladiny cytokininů jsou během buněčného cyklu přísně regulovány (Roef a Onckelen, 2010).

2.8.3 Regenerace orgánů

Účinky cytokininů ve spojení s účinky auxinů tvoří základ regeneračních procesů *in vitro* i *in vivo*. Důležitým faktorem je poměr koncentrací těchto fytohormonů, který rozhoduje o průběhu regenerace. Vyrovnaný poměr těchto fytohormonů vede ke tvorbě kalusu, tedy nediferencovaného pletiva, kdežto naopak nadbytek cytokininů způsobuje regeneraci prýtu a nadbytek auxinů vyvolává regeneraci kořenů (Su *et al.*, 2011).

Výjimečnou schopností rostlin je schopnost nahradit nebo obnovit poraněné tkáně či struktury. Tato mimořádná plasticita vývojové a regenerační cesty je funkcí znovuzískané funkce totipotence (Féher, 2019). Způsobů, kterými může dojít k regeneraci je spousta. Jedním z nich je například organogeneze (vytvoření jednotlivých orgánů), dalším způsobem může být somatická embryogeneze (vytvoření bipolární struktury), která obsahuje jak výhonky, tak kořenový meristém. Organogeneze a somatická embryogeneze zahrnují přímé i nepřímé procesy, kterými rostliny mohou reagovat na ztráty nebo poškození způsobené různorodými stresory (Gamborg a Phillips, 1995; Ikeuchi *et al.*, 2019).

Právě cytokininy řadíme mezi jednu z nejdůležitějších skupin fytohormonů, jež se používají k exogennímu vyvolání odpovědi *in vitro* (Miller *et al.*, 1955). Cytokininy se nacházejí v celých rostlinných organismech a jejich syntéza probíhá v různých typech buněk a kořenů (Cortleven *et al.*, 2019). Právě deriváty *N*6-substituovaného adeninu s isoprenoidními postranními řetězci se nejvíce podílejí na růstu a vývoji rostlin. Mezi tyto procesy můžeme zařadit udržování meristému, interakce sink-zdroj, reakce na biotický a abiotický stres, indukce rostlinné imunity, buněčné dělení a stárnutí listů (Kamada-Nobusada a Sakakibara, 2009; Kieber a Schaller, 2018; Akhtar *et al.*, 2020).

2.8.4 Regulace růstu rostliny

Jednou z dalších úloh cytokininů je podpora růstu a vývoje rostlin. Za normálních podmínek hrají klíčovou roli v odolnosti vůči stresovým podmínkám. Zároveň zabraňují stárnutí rostlin, inhibicí rozkladu chlorofylu, nukleových kyselin, proteinů a dalších látek obsažených v rostlinách. Znovu převedení důležitých aminokyselin, hormonů, anorganických solí a jiných sloučenin do rostlinných tkání (Ullah *et al.*, 2018). Cytokininy se též podílí na zmírňování účinků různých abiotických stresů na rostlinu (Prerostova *et al.*, 2018; Keshishian *et al.*, 2018; Mi *et al.*, 2017).

2.8.5 Apikální dominance

Apikální dominance je především závislá na poměru auxinů a cytokininů. (Klee a Romano, 1994; Li a Bangerth, 1992) Mezi cytokininy a auxiny se zde projevuje antagonistický vztah, kdy cytokininy potlačují apikální dominanci a auxiny ji naopak podporují. Větvení nadzemní části rostliny je stimulováno endogenní aplikací cytokininů. Mimo stimulace růstu se cytokininy podílejí i na zakládání pupenů (Procházka, 1998; Kebrom *et al.*, 2016; Geem *et al.*, 2024).

Aktivita a tvorba novým axilárních meristémů je závislá na určitých podmínkách, např. genotypu rostliny, vývojovém stádiu a prostředí, kde se rostlina nachází a roste. Rovněž záleží na faktorech, jako je délka dne, teplota, kvalita a intenzita světla, a přísun živin. Nedávné zjištění poukázalo na skutečnost, že strigolaktony, neboli skupina seskviterpenových laktonů odvozených od karotenoidů, či jejich deriváty, hrají klíčovou roli při inhibici větvení výhonků. Spolupůsobení vnitřních a vnějších faktorů reguluje aktivitu pupenů přes vzájemně propojené signální transdukční dráhy (Müller a Leyser, 2011). Tvorba nových axilárních pupenů může být zpomalena rostoucím vrcholem výhonku. Odstranění tohoto vrcholu výhonku způsobuje uvolnění tzv. spících axilárních pupenů pod ním a výsledkem je tvorba větvení. Apikální dominance soustřeďuje zdroje rostlin do hlavní růstové osy, kdežto aktivace spících pupenů umožňuje regeneraci po poškození nebo ztrátě hlavního výhonku (Müller a Leyser, 2011).

Hlavním signálním hormonem pro apikální dominanci je auxin, jenž je syntetizován na vrcholku výhonů mladých listů (Ljung *et al.*, 2001). Jeho aplikace na poškozené vrcholy výhonků může zastoupit rostoucí vrchol při obnovení inhibice větvení (Thimann a Skoog, 1993).

Hlavním místem výskytu cytokininů v rostlině jsou kořeny, které jsou však transportovány do výhonků pomocí transpiračního proudu v xylému. Je známo, že výhonky odpovídají za regulaci transportu cytokininů z kořenů. Velmi nízké koncentrace cytokininů jsou naopak v xylémové míze (Foo *et al.*, 2007).

2.8.6 Senescence listů

Senescence neboli poslední fáze, vývoje je definována jako aktivní a organizovaný proces. Ten je často spojovaný s celou řadou omezení pro rostlinu např. se snížením rychlosti až inhibicí fotosyntézy (Buchanan-Wollaston, 1997), degradací proteinů (Humbeck *et al.*, 1996) a nukleových kyselin (u RNA je rychlejší než u DNA) (Kozlowski a Pallardy, 1997). Dále může být spojován s poklesem obsahu chlorofylu a remobilizací živin ze zdrojových tkání, jako jsou zralé listy nebo kořeny, plody nebo mladé listy (Smart, 1994; Gan a Amasino, 1997). Proces stárnutí listů, který předchází přirozenému opadávání listů, souvisí se snižováním koncentrace a aktivit cytokininů (Gan a Amasino, 1996). Tento proces je doprovázený masivními transkripčními a metabolickými změnami, které se podílejí na destabilizaci intracelulárních organel a makromolekul, dále přenášejí živiny do vyvíjejících se tkání a zásobních orgánů (Causin *et al.*, 2006). Rozpad fotosyntetického aparátu může být urychlen, ale též zpomalen, což může být ovlivněno různými faktory. Přítomností ABA a ethylenu dochází k urychlení stárnutí (Smart, 1994; Grbić a Bleeker, 1995), naproti tomu přidáním exogenních hladin cytokininů dochází k inhibici degradace chlorofylu a fotosyntetických proteinů (Richmond a Lang, 1957; Badenoch a Jones *et al.*, 1996).

Iniciace stárnutí listů je velmi přísně regulována endogenními hladinami různých typů fytohormonů a jejich metabolitů (Woo *et al.*, 2019; Kusaba *et al.*, 2013) a zároveň vnějšími podmínkami zahrnující vysokou salinitu, sucho, vysoké teploty a zvýšenou koncentraci patogenů (Gepstein *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2012).

Nejenom v *Arabidopsis*, ale i v dalších rostlinách bylo identifikováno spousta transkripčních faktorů, jež se podílejí na regulaci stárnutí listů (Sakuraba, 2021). Jednou z dalších možností pozdržení senescence u transgenních rostlin produkujících cytokininy je exprese bakteriálního genu *IPT* (Gan a Amasino, 1995). Na snížení senescence se může podílet i snížení poměru červeného světla, jenž dopadá až ke spodním listům rostliny (Rousscaux *et al.*, 1996). Snížená intenzita světla či úplná tma je jedním z důvodů snížené exprese genů, které jsou závislé na světelných podmínkách, a též je zodpovědná za vymizení fotosyntetických proteinů a chlorofylu (Thomas, 1978).

Během procesu stárnutí může docházet ke zvýšení koncentrace jednotlivých cukrů v listech (Crafts-Brandner *et al.*, 1984). Akumulace těchto cukrů vyvolaná přerušením či propadnutím hladin floému může urychlovat nebo i zpomalovat proces stárnutí (Crafts-Brandner *et al.*, 1984; Frohlich a Feller, 1991) a zároveň může vést u nestárnoucích listů k poklesu zeleného barviva a k poklesu fotosyntetických proteinů (Krapp *et al.*, 1990; Stitt *et al.*, 1990; Krapp a Stitt *et al.*, 1994). Z těchto důvodů je důležité, aby hromadění cukrů v listech bylo závislé i na jiných faktorech, např. poměr C:N v listech (Paul a Driscoll, 1997), či na intenzitě (Dijkwel *et al.*, 1997) nebo regulátorech růstu rostlin (Koch, 1996).

Během stárnutí dochází k snížení rychlosti fotosyntézy a s tím spojeného úbytku fotosyntetických enzymů. Nejen u těchto enzymů dochází ke snížení jejich množství, ale i

pektinmethylesteráz, zatímco u RNáz a některých hydroláz dochází k zvýšení jejich hladin (Laurière, 1983).

2.9 Světlo a jeho vliv na cytokininy

Světlo řadíme mezi jeden z nejvýznamnějších environmentálních signálů pro rostliny. Podílí se na modulaci širokého spektra procesů vývoje rostliny, např. klíčení semen, pohyby listů, indukce květů, prodloužení stonku. Všechny zmíněné procesy podléhají regulaci fytohormonů (Nováková *et al.*, 2005). Zároveň je velmi důležitým faktorem při kontrole endogenních hladin cytokininů, jelikož se podílí na regulaci jejich biosyntézy, degradace a transportu (Zubo *et al.*, 2008; Ananieva *et al.*, 2008; Mizuno *et al.*, 1971) Regulace vývoje rostlin též především závisí na kvalitě spektra, kvantitě a periodicitě a směru světelného záření (Chen *et al.*, 2004; Kami *et al.*, 2010).

Interakce mezi vývojovými regulacemi, které jsou zprostředkované světlem, a cytokininy jsou známy už delší dobu. Poprvé byly charakterizovány Millerem (1956), který je autorem popisu několika reakcí vyvolaných ve tmě cytokininem – kinetinem. Byly popsány i další interakce mezi cytokininy spolu s dalším světlem ovlivněnými procesy, jako např. syntéza betacyaninu (Koehler, 1972), akumulace anthokyanů (Kasemir a Mohr, 1982), prodloužení hypokotylu (Cohen *et al.*, 1991) či vývoj chloroplastů a genová exprese (Feierabend a Boer, 1978; Flores a Tobin, 1986; Reski *et al.*, 1991; Smart *et al.*, 1991).

V rostlinách bylo prozatím identifikováno jen okolo několika tříd fotoreceptorů. Konkrétně u *Arabidopsis thaliana* rozeznáváme tři typy fotoreceptorů. Prvním typem jsou fytochromy (phys), jež specificky reagují na červené světlo a daleké červené světlo. Druhým typem jsou receptory pro modré světlo, kam lze zařadit fototropiny (phot), kryptochromy (cry) a proteiny ZEITLUPE (ZTL), které také patří mezi receptory modrého světla (Chen *et al.*, 2004) a obsahují doménu pro absorpci světla nazvanou LOV. Třetím typem jsou proteiny UVR8 (Rizzini *et al.*, 2011; Kami *et al.*, 2010) citlivé na UV-B světlo sloužící jako signální složka pro UV-B a podílí se na řízení exprese řady genů s životně důležitými funkcemi ochrany proti UV záření (Li *et al.*, 2011; Tilbrook *et al.*, 2013; Jenkins, 2014; Christie *et al.*, 2015; Kong a Okajima, 2016; Liu *et al.*, 2016). Přítomnost chromoforů zajišťuje absorpci světelných signálů a zároveň jsou schopné je přeměnit na biochemické signály (Kong a Okajima, 2016).

Největší podíl na vnímání světla mají právě fytochromy, tzv. receptory červeného světla (Quail *et al.*, 1995, Li *et al.*, 2011; Rockwell *et al.*, 2006). Fytochromy jsou charakteristické pro odpovědi na červené a dlouhovlnné červené světlo a absorbují fotokonvertibilní chromoproteiny. Obsahují kovalentně navázanou molekulou kofaktoru schopnou absorbovat světlo, čímž je obstarána fotokonvertibilita. Jednotlivé interakce mezi světelným zářením a cytokininy mohou být synergické

(zajišťující vývoj chloroplastů a cytokininů) či aditivní (inhibují prodlužování hypokotylů a cytokininů) nebo antagonistické (klíčení a ABA) (Nováková *et al.*, 2005).

2.9.1 Cytokinininy a jejich vztah s fytochromy

Fytochromy spolu s fytohormony se podílejí na růstu rostlin. Podle mnohočetných genetických studií světlo přímo ovlivňuje buněčnou hladinu určitých fytohormonů, přenos jejich signálů a zároveň se mohou podílet i na přenosu signálu fotoreceptorů. Během transdukce signálních molekul je zahrnut i přenos a konverze extracelulárních signálů jako odpověď na intracelulární buněčné odpovědi, kde je světlo klíčovým faktorem regulujícím růst rostlin (Lymperopoulos *et al.*, 2018).

Fytochromy patří k nejdůležitějším sensorům v rostlinách řadící se mezi fotoreceptory. Skládají se ze dvou fotointerkonvertibilních forem – Pr a Pfr. Forma Pr je charakteristická absorpcí červeného světla o vlnové délce cca 667 nm. Forma Pr je následně přeměněna na formu Pfr. Hlavní funkcí fytochromů v rostlinách je jejich využití při růstu v nepříznivých podmínkách, což může zahrnovat i růst ve stinných místech (Lymperopoulos *et al.*, 2018).

V rostlinách byly detekovány fytochromy P, které funkčně odpovídají světelným receptorům, jenž se podílejí se na vývoji a růstu rostlin ve viditelném světle při různých vlnových délkách (Rockwell *et al.*, 2006). Tyto fytochromy jsou schopné detekovat a pracovat s červeným světlem (R) a s dalekým červeným světlem (FR) z okolního prostředí. Navíc mohou určit poměr R/FR světla a stanovit tak fotosynteticky aktivní světlo. Na základě těchto poznatků jsou fytochromy schopny zapojit mechanismy u rostlin pro vyhýbání se stínu podle nutnosti (Sage, 1992; Rockwell *et al.*, 2006).

Další funkcí fytochromů je získávání informací o sousedních rostlinách a o dostupnosti fotosyntetické energie (Chen a Chory, 2011). Fytochromy jsou proteiny sloužící k detekci červeného a dalekočerveného záření. Tyto dimerické proteiny jsou syntetizovány ve formě absorbující červené světlo (Pr) ve tmě a po jeho absorpci dojde k přeměně na Pfr formu absorbující daleké červené světlo. Daleké červené světlo je odpovědné za zpětnou přeměnu Pfr na Pr. Velká spousta reakcí koreluje s množstvím Pfr, a proto je možné fytochromy označovat jako spínače regulované světlem (Rockwell *et al.*, 2006).

PfrB je stabilizován za pomoci ARR4. ARR4 patří mezi regulátory odezvy identifikovaných u *Arabidopsis* (Urao *et al.*, 2000). U bakterií jsou tyto regulátory zodpovědné za signalizaci na různé podmínky. U *Arabidopsis* je přítomno více jak 10 sensorových kináz (Inoue *et al.*, 2001) a receptory pro cytokinininy jsou též členy sensorových histidinkináz. Rostlinné fytochromy mají doménu, která přímo souvisí s histidinkinázou. Důkaz o aktivitě této histidinkinázy není však zcela potvrzen, důvodem může být i absence některých klíčových zbytků v této doméně histidinkináz (Lomin *et al.*, 2012; Schaller *et al.*, 2008; Inoue *et al.*, 2001; Yamada *et al.*, 2001; Mougél a Zhulin, 2001; Anantharaman a Aravind, 2001).

2.9.2 Cytokininy a jejich vztah s kryptochromy

Fotosyntéza představuje jednoho z klíčových faktorů pro rostliny, proto se rostliny musí neustále přizpůsobovat změnám světelných podmínek. Mají plno fotoreceptorů pro vnímání různě široké škály vlnových délek spektra (Chen *et al.*, 2004). Výše zmíněné fytochromy slouží jako receptory pro vnímání červeného a daleko červeného světla, naopak kryptochromy (CRY1 a CRY2 u *Arabidopsis*) jsou především specifické pro procesy, jako je vývoj a růst závislý na světelných podmínkách, tzv. fotomorfogeneze v modrém světle. Jednou z funkcí kryptochromů je přenos elektronů závislý na modrém světle (Giovani *et al.*, 2003; Zeugner *et al.*, 2005), kdy výsledkem je konformační změna umožňující interakci s „downstream“ signálními částicemi (Yang *et al.*, 2000). U jednotlivých komponentů izolovaných z *Arabidopsis* bylo zjištěno, že jsou schopné přímo interagovat s kryptochromy (Wang *et al.*, 2001; Yang *et al.*, 2001; Ahmad *et al.*, 1998a,b). Příkladem interagujícího komponentu je COP1 (CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC1) (Wang *et al.*, 2001; Yang *et al.*, 2001), dalším komponentem může být E3, tzv. ubikvitin ligáza, která působí jako negativní regulátor fotomorfogeneze u etiolovaných semenáčků (Bauer *et al.*, 2004; Ma *et al.*, 2002). COP1 se podílí na tvorbě proteinových komplexů a všechny proteiny zapojené do tvorby těchto komplexů, ať již interagují přímo či nepřímo právě s COP1, jsou s velkou pravděpodobností zapojeny do kryptochromové signalizace. Jedná se např. o supresor fytochromu A1 (SPA1) (Saijo *et al.*, 2003), složky signalosomu COP9 (Wei a Deng, 2003) a DET1, COP10 a DDB komplex (Yanagawa *et al.*, 2004).

Fotomorfogeneze závislá na modrém světle je u *Arabidopsis* regulována právě pomocí fotoreceptorů kryptochromového flavinového typu, které odpovídají za kontrolu inhibice růstu hypokotylu, rozrůstání dělohy a listů. Cytokininy indukují podobné reakce, když jsou exogenně přidány ke klíčícím semenáčkům, což poukazuje na možné spojení mezi kryptochromy a cytokininovými signálními cestami v souvislosti ve spojení s fotomorfogenezí (Vandenbussche *et al.*, 2007).

2.9.4 Světlo ve vztahu k senescenci listů

Světlo patří mezi hlavní regulátory různých biologických procesů v životním cyklu rostlin. Vlastnosti rostlin jsou ovlivňovány odlišnými charakteristikami světla, např. vlnovou délkou, rychlostí proudění či fotoperiodou (Folta a Childers, 2008). Schopností rostlin je transformovat světelnou energii na chemickou a to prostřednictvím fotosyntézy. Mimo jiné jsou rostliny schopné zachytit světelnou energii pomocí různých fotoreceptorů, které vnímají určité vlnové délky světla pomocí procesu světelné signalizace (Kami *et al.*, 2010).

Rostliny vnímají světlo v spektrálním rozsahu 300–800 nm, což je záření, které se pozitivně podílí na růstu a vývoji (Kami *et al.*, 2010). Fotosyntézou je využíváno záření v rozsahu 400 až 700 nm (McCree, 1972). Různorodé sady fotoreceptorů umožňují rostlinám vnímat široké spektrum světelného záření od ultrafialového-B (UV-B, 280-315 nm) po dalekočervené (700-800 nm). Receptory pro

vnímání modrého světla a UV-A světla jsou kryptochromy, jež se podílejí na regulaci spousty biologických jevů a zároveň na cirkadiánním rytmu, kvetení a fotomorfogenezi. Naopak pro vnímání pouze modrého světla jsou receptory fototropiny, které regulují pohyb chloroplastů a otevírání průduchů (Lin, 2000). Fytochromy jsou jediné fotoreceptory, které vnímají červené a dalekočervené světlo a regulují řadu fyziologických procesů od kvetení počínaje, přes klíčení semen a deetiolaci sazenic až k vyhýbáním se stínů (Li *et al.*, 2011).

Právě červené světlo má podle studií ze 70. a 80. let 20. století vliv na iniciaci stárnutí listů, na zpomalení degradace chlorofylu a na zpomalení senescence v listech ječmene (*Hordeum vulgare L.*) (Biswal *et al.*, 1976; Pfeiffer *et al.*, 1980), rajčete (*Solanum lycopersicum L.*) (Tucker, 1981) a okurky (*Cucumis sativus L.*) (Cohen *et al.*, 1991).

Na druhou stranu dalekočervené světlo naopak urychluje stárnutí listů. Ve stínu, kde dochází ke snížení poměru červeného a dalekočerveného světla, je urychlován proces žloutnutí listů (Brouwer *et al.*, 2012). Ozářením tímto typem světla dochází k přeměně aktivní formy Prf na neaktivní formu Pf (Li *et al.*, 2011), což může být jeden z důvodů, který vede k rychlé degradaci listů.

Předčasné stárnutí listů může být vyvoláno i nepříznivými podmínkami prostředí, jako je nedostatek živin, dlouhodobá tma, sucho, stíny, infekce patogeny nebo poranění (Lim *et al.*, 2007; Yoshida, 2003; Guo a Gan, 2005).

2.10. Cirkadiánní rytmus ve vztahu s cytokininy

Cirkadiánní regulace jsou pro všechny organismy velmi podobné. Všechny rytmy jsou resetovány buď světelnými nebo teplotními signály charakteristickým způsobem, který zorganizuje synchronizaci hodin s okolním prostředím. Tento proces je zásadní pro zabezpečení toho, aby rytmické procesy probíhaly ve vhodné denní dobu, tzv. v cirkadiánní fázi. Cirkadiánní rytmy v přírodě jsou orientovány na 24hodinový cyklus, tzv. den/noc. Velmi důležitou funkcí je napomáhání k správné fyziologii rostlin (Eriksson a Millar, 2003).

Celá řada procesů v přírodě je pod kontrolou rytmického denního cyklu. U mnoha organismů, jak prokaryotního, tak eukaryotního typu jsou pozorovány 24hodinové rytmy generované cirkadiánními systémy (Reppert a Weaver, 2002; Eriksson a Millar, 2003). Nejen živočichové, ale i rostliny jsou za pomoci vnímání různých podmínek prostředí, kam spadá světlo a teplota, schopny sladit tyto informace spolu se svými cirkadiánními hodinami, aby si stanovily délku dne a jednotlivé sezónní výkyvy (Eriksson a Millar, 2003; Mizuno, 2004).

U modelové rostliny *Arabidopsis* byly za pomoci molekulárně genetických technik (Eriksson a Millar, 2003) identifikovány a analyzovány (Alabadi *et al.*, 2001) tři hlavní třídy genů, které kódují transkripční faktory související s Myb doménou *CCA1* (CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1) (Wang *et al.*, 1998) a *LHY* (LATE ELONGATED HYPOCOTYL) (Shaffer *et al.*, 1998) a regulátor

pseudoresponse *TOC1* (TIMING OF CAB EXPRESSION 1) (Strayer *et al.*, 2000; Alabadí *et al.*, 2001). Tento regulátor je známý též jako *Arabidopsis PRR1* (PSEUDORESPONSE REGULATOR 1). Mezi ranně či pozdě v noci exprimované transkripční faktory řadíme *CCA1* a *LHY*, stejně tak i členy rodiny proteinů PRR (PRR7 a PRR9) (Sanchez a Kay, 2016; McClung, 2019; Nakamichi, 2020). *CCA1* a *LHY* se váží na večerní komplex (EC – „evening complex“) promotoru *TOC1* a potlačují tak jeho expresi. (Harmer *et al.*, 2000; Alabadí *et al.*, 2001; Mizoguchi *et al.*, 2002). EC komplex je složen z *ELF3* (EARLY FLOWERING 3), *ELF4* a *LUX/PCL1* (LUX ARRHYTHMO/PHY TOCLOCK1). Právě EC komponenty hrají klíčovou roli pro vysokoamplitudové denní cirkadiánní rytmy *CCA1* a *LHY* (Doyle *et al.*, 2012; Hazen *et al.*, 2005; Kolmos *et al.*, 2009; Dixon *et al.*, 2011).

Další členové rodiny PRR, PRR5 a *TOC1*, jsou exprimovány později během dne nebo těsně před soumrakem (Sanchez a Kay, 2016; McClung, 2019; Nakamichi, 2020). *TOC1* potlačuje transkripci *CCA1* a *LHY* (Gendron *et al.*, 2012; Huang *et al.*, 2012). Dále se na potlačení exprese podílejí PRR9, PRR7 a PRR5, jenž jsou většinou exprimovány v průběhu celého dne (Nakamichi *et al.*, 2010). Tyto tzv. „hodinové geny“ fungují uvnitř nebo v blízkosti cirkadiánních hodin jednotlivých buněk a tvoří negativní zpětnovazebné smyčky cirkadiánního oscilátoru (Alabadí *et al.*, 2001; Gendron *et al.*, 2012). Produkty těchto buněk mají na starost udržování oscilace, které pohání všechny ostatní cirkadiánní rytmy (Eriksson a Millar, 2003).

Cirkadiánní hodiny regulují širokou škálu procesů v rostlinách – fotosyntézu, buněčný cyklus, dobu kvetení nebo stresové odpovědi (Millar, 2016). Rostliny s vnitřními hodinami, které odpovídají vnějšímu dennímu cyklu, vykazují zvýšenou fotosyntetickou účinnost a též i lepší kondici v porovnání s jinými rostlinami, které nemají hodiny synchronizovány s okolním prostředím (Dodd *et al.*, 2005).

Bylo prokázáno, že i cytokininy se podílejí na reakcích rostlin při odlišných podmínkách prostředí (Ha *et al.*, 2012). Obecně velká oblast genů, jež je regulována hodinami, je též regulovaná cytokininy (Covington *et al.*, 2008;). Jednotlivé růstové odpovědi, které jsou zpracovávány pomocí cytokininů, mohou být ovlivňovány i u mutantů hodin (Zheng *et al.*, 2006). Důsledkem toho jsou hodiny považovány za přímé či nepřímé modulatory signalizace cytokininů. Propojení mezi hodinami a cytokininy vzniklo na základě signalizace, která poukazovala na skutečnost, že večerní komplex potlačuje účinek genů, jež souvisejí s cytokininy např. *Arabidopsis* regulátor odezvy 6 (*ARR6*), *ARR7*, *CYTOKININOXIDASE5*, *CYTOKININ RESPONSE FACTOR 4* (*CRF4*) a *CRF5* (Ezer *et al.*, 2017). Exprese regulátoru odezvy *Arabidopsis* typu A, *ARR9*, je řízena kromě cytokininů právě i cirkadiánními hodinami. Bylo ovšem zjištěno, že cirkadiánní regulace je zcela nezávislá na cytokininech (Ishida *et al.*, 2008).

Cytokininová signalizace může cirkadiánní funkci regulovat zpětně. Ošetření prováděné za pomoci exogenní aplikace cytokininů způsobuje oddálení cirkadiánní fáze a indukuje expresi *CCA1* a *LHY* podobně, jako ranní fázový výstupní gen *CHLOROPHYL A/B-BINDING PROTEIN 2* (*CAB2*). Naopak však stejné ošetření potlačuje *TOC1* (Hanano *et al.*, 2006; Zheng *et al.*, 2006). Je velmi pravděpodobné, že regulace cirkadiánní genové exprese zprostředkována cytokininy je řízena právě

hodinami, jelikož je závislá na denní době (Hanano *et al.*, 2006). Nejedná se však o jediný faktor, dalším je např. dávka, jelikož léčba vysokými nebo naopak nízkými koncentracemi cytokininů navozuje opožděnou nebo pokročilou fázi (Salomé *et al.*, 2006).

2.11 Metody analýzy a detekce cytokininů

Mezi jedny z dříve používaných metod pro kvantifikaci cytokininů byly biologické testy a imunotesty. Nevýhodou těchto biotestů byla hlavně časová náročnost a ekonomické i ekologické hledisko. Mezi imunologické techniky byly řazeny radioimunoanalýza (RIA) (Grayling *et al.*, 1992) a enzymatická imunoesej (ELISA – „Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay“) (Maldiney *et al.*, 1986; MacDonald *et al.*, 1981; Strnad *et al.*, 1992). Dnes už již málo používané metody byly za svých dob řazeny mezi jedny z velmi citlivých technik.

Jednotlivé rostlinné extrakty obsahují velice složité vícesložkové směsi. Cytokininy se vyskytují ve velmi nízkých koncentracích, a proto je pro jejich stanovení velmi důležitá předúprava vzorku a následná potřeba použít dostatečně citlivé a selektivní purifikační metody a analytické přístroje pro měření jednotlivých cytokininových metabolitů (Tarkowski *et al.*, 2009). Pro extrakci analytů z rostlinného materiálu se používají převážně organická rozpouštědla, jako např. Bieleskieho pufr (methanol, redestilovaná voda, kyselina mravenčí, chloroform), 80% methanol nebo modifikovaný Bieleskieho pufr (methanol, redestilovaná voda, kyselina mravenčí) (Hoyerová *et al.*, 2006; Svačinová *et al.*, 2012). Poté následuje extrakce pevnou fází (SPE) za použití sorbentů s reverzní fází (C18) a katexů (Dobrev *et al.*, 2002; Takei *et al.*, 2003). Posledním krokem bylo vyizolování sledovaných sloučenin z rostlinných extraktů pomocí imunoafinitní chromatografie s vhodnými navázanými protilátkami (Hauserová *et al.*, 2010; Novák *et al.*, 2008). I když se jednalo o velmi citlivou a selektivní metodu, časová náročnost a ekonomické hledisko přispělo k vývoji nových miniaturizační metod. Pro zjednodušení SPE kroku byla vyvinuta StageTip metoda (Svačinová *et al.*, 2012) a pro urychlení imunoafinitní chromatografie zase jednokroková mikro-magnetická imunoafinitní chromatografie (μ MIAC) (Plačková *et al.*, 2017).

2.11.3 Purifikace pomocí StageTip

V dnešní době hojně rozšířenou purifikační metodou je PT-SPE („Pipette Tip Solid Phase Extraction“), u které je vhodný sorbent ve formě malých disků vlastnoručně naplněn do 200 μ l pipetovacích špiček (Keough *et al.*, 2002; van Hout *et al.*, 2002; Pluskal *et al.*, 2002). StageTip metoda („Stop And Go Extraction Tip“) byla vyvinuta jako velmi jednoduchá a ekonomicky dostupná technika, která se používá k purifikaci fytohormonů z malého množství analytu a je doplněna analýzou pomocí HPLC-MS/MS systému (Rappsilber *et al.*, 2003; Ishima *et al.*, 2006; Saito *et al.*, 2006). Jejich výhodou je kombinace

flexibility, jednoduchosti a rychlosti použití zaručující vysokou výtěžnost na základě fyzikálně-chemických vlastností (Svačinová *et al.*, 2012). Použitím modifikovaného Bieleškiého pufru, jako extrakčního činidla, jsou cytokininy v tomto prostředí nabíjeny kladným nábojem, což umožňuje použití kationtově-výměnného sorbentu StageTipů. Tento sorbent obsahuje silnou sulfonovou skupinu, kde dochází k jejich záchytu. Pro zvýšení absorpční kapacity StageTipů se mohou kombinovat jak různé fáze sorbentů, tak i počet jejich jednotlivých vrstev (3x C18/3x SDB/3x Cat.-SR pro cytokininy (Svačinová *et al.*, 2012) a 3x C18/3x SDB-XC pro auxiny (Pěnčík *et al.*, 2018)).

2.11.2 Ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie (UHPLC) je separační technika využívající kolony s částicemi o velikosti 2-2,5 μm (Walter a Andrews, 2014). UHPLC pracuje na principu jako HPLC (Singh *et al.*, 2016), ale při snížení velikosti částic kolony dochází k zvýšení její účinnosti, rozlišení, citlivosti a rychlosti propustnosti vzorku (Samatha *et al.*, 2015). Systém UHPLC-MS/MS je spojení chromatografické techniky (UHPLC) s tandemovou hmotnostní spektrometrií (MS/MS) (Phalke a Kavade, 2013) a stala se hlavní volbou při analýze cytokininů po předchozím přečištění vzorků pomocí prekoncentračních metod (Novák *et al.*, 2003). Rychlá chromatografická separace komplexních vzorků využívá schopnosti rychlého skenování hmotnostního spektrometru pro stanovení velmi nízkých koncentrací analytů na piko- až femto-molárních hladinách (Svačinová *et al.*, 2012).

3 MATERIÁL A METODY

3.1 Biologický materiál

Pro praktickou část bakalářské práce byla použita semena modelové rostliny *Arabidopsis thaliana* (ekotyp Columbia), která byla pěstována ve sterilních miskách na médiu podle Murashigeho a Skooga (MS médium) ve fytotronu s přesně nastavenými světelnými podmínkami (8/16h, 12/12h, 16/8h). 10-ti denní rostliny *A. thaliana* byly poté sklizeny a uskladněny v hlubokomrazícím boxu při -70 °C pro další zpracování.

3.2 Chemikálie a použité roztoky

- Aceton p.a., Lachner (Neratovice, Česká republika)
- Ethylalkohol pro UV spektroskopii (99,8%), Lach-Ner s.r.o (Neratovice, Česká republika)
- Hydroxid amonný 25% pro LC-MS, Merck KGaA (Darmstadt, Německo)
- Kyselina dusičná (68%), VWR Chemicals S. A. S. (Fontenay-sous-Bois, Francie)
- Kyselina mravenčí 98% - 100% pro LC-MS, Merck KGaA (Darmstadt, Německo)
- Kyselina mravenčí p.a., Honeywell (Seetze, Německo)
- Methanol ($\geq 99,9\%$) gradient grade for liquid chromatography, LiChrodoly, Merck KgaA (Darmstadt, Německo)
- Murashige & Skoog médium, Duchefa Biochemie (Haarlem, Nizozemí)
- Plant agar, Duchefa Biochemie (Haarlem, Nizozemí)
- Redestilovaná voda z Millipore Simplicity™
- Sacharóza p.a., Penta (Praha, Česká republika)
- Tween®20, Sigma Aldrich (Darmstadt, Německo)
- Izotipicky značené cytokininové standardy, Laboratoř růstových regulátorů Univerzity Palackého (Olomouc, Česká republika)

Báze (B+R, NG): [$^2\text{C}_5$]cZ, [$^2\text{H}_5$]cZ7G, [$^{13}\text{C}_3$]tZ, [$^2\text{H}_5$]tZR, [$^2\text{H}_5$]tZ7G, [$^2\text{H}_5$]tZ9G, [$^2\text{H}_3$]DHZ, [$^2\text{H}_3$]DHZR, [$^2\text{H}_6$]iP, [$^2\text{H}_6$]iPR, [$^2\text{H}_6$]iP7G, [$^2\text{H}_6$]iP9G, [$^2\text{H}_7$]BAP, [$^2\text{H}_7$]BAPR, [$^2\text{H}_7$]BAP7G, [$^2\text{H}_7$]BAP9G, [$^{15}\text{N}_4$]mT, [$^{15}\text{N}_4$]mTR, [$^{15}\text{N}_4$]mT7G, [$^{15}\text{N}_4$]mT9G, [$^{15}\text{N}_4$]oT, [$^{15}\text{N}_4$]oTR, [$^{15}\text{N}_4$]oT7G, [$^{15}\text{N}_4$]oT9G, [$^{15}\text{N}_4$]pT, [$^{15}\text{N}_4$]pTR, [$^{15}\text{N}_4$]pT7G, [$^{15}\text{N}_4$]pT9G, [$^{15}\text{N}_4$]K

O-glukosidy (OG): [$^2\text{H}_5$]tZOG, [$^2\text{H}_5$]tZROG, [$^2\text{H}_7$]DHZOG

Nukleotidy (NT): [$^2\text{H}_5$]tZR5'MP, [$^2\text{H}_3$]DHZR5'MP, [$^2\text{H}_6$]iPR5'MP, [$^2\text{H}_7$]BAPR5'MP

Roztoky:

- Sterilizační roztok [70% ethanol (9,99 ml/10 ml) + 0,1% Tween20 (0,01 ml/10 ml)]
- Modifikovaný Bielecki pufr [75% methanolu (750 ml/l) + 5 % kyseliny mravenčí (50 ml/l) + 20% redestilované vody (200 ml/l)]
- 50% kyselina dusičná (735 ml/l kyseliny dusičné + 265 ml/l redestilované vody)
- 0,5M roztok hydroxidu amonného v 60% methanolu – eluční roztok CKs (0,775 ml/10 ml hydroxidu amonného + 6 ml/10 ml methanolu + 3,225 ml/ l redestilované vody)
- 15mM mravenčan amonný (pH 3,95) (0,566 ml/l kyseliny mravenčí, upraveno 25% roztokem hydroxidu amonného na pH 3,95)
- 10% methanol (1ml/10 ml methanolu + 9 ml/10 ml redestilované vody)

Stacionární fáze pro SPE purifikaci a kolona pro kapalinovou chromatografii:

- Empore™ Styren divinyl benzen (SDB-RPS), 47 mm Extrakční disky, Supelco, Bellefonte, PA, USA
- Empore™ Cation, 47 mm Extrakční disky, Supelco, Bellefonte, PA, USA
- Pro UHPLC byla použita kolona s reverzní fází Waters UPLC® BEH C18 (rozměry 1,7 µm: 2,1 x 150 mm), Waters (Milford, MA, USA)

3.3 Přístrojové vybavení laboratoře

- Acquity UPLC® I-class systém (Waters, Milford, MA, USA) v zapojení s Xevo™ TQ-S MS (Waters MS Technologies, Manchester, UK) zahrnuje ionizační elektrosprej ESI. Výsledná data zpracována pomocí MassLynx® softwaru s TargetLynx™ programem (verze 4.2, Waters, Milford, MA, USA)
- Analytické váhy, Sartorius Weighing Technology GmbH (Goettingen, Německo)
- Autokláv Sanyo MLS-378 1L, Sanyo (Japonsko)
- Centrifuga Avanti™ 30, Beckman Coulter (Brea, CA, USA)
- Centrifuga Hettlich Micro 220R, Hettlich GmbH (Tuttingen, Německo)
- Flowbox-laminární Heraguard ECO 1.2, Thermo Electron LED GmbH, Thermo Scientific (Langenselbold, Německo)
- Fytokomora Percival AR-100L3, Percival Scientific (Perry, IA, USA)
- Kulový mlýnek MM301, Retsch® & Co. KG (Hann, Německo)
- Millipore Simplicity™ water purification systém, Millipore Corp (Billerica, MA, USA)
- pH metr CyberScan 500, Oakton® (Vernon Hills, IL, USA)
- Stolní laboratorní rotátor Stuart SB3-BB Science, Keison Products (Chelmsford, Velká Británie)

- Stolní vortex typ Wizard, Velp Scientifica (Usmate, Itálie)
- Ultrazvuková lázeň Transsonic T310, ELMA[®] Schmidbauer GmbH (Singen, Německo)
- Vakuová rotační odparka Trigon-plus[®] RCT1010, Thermo Electron Corporation – k 2006 Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)

3.4 Příprava biologického materiálu

3.4.1 Příprava kultivačního média

10denní rostliny *A. thaliana* byly pěstovány na MS médiu dle Murashige & Skooga (Murashige a Skoog, 1962), které bylo připraveno navážením 10 g sacharózy a 2,2 g MS média. Obě směsi byly smíchány s 1l destilované vody a upraveno na pH 5,6. Následně bylo do každé ze 4 autoklávovacích nádob naváženo 1,75 g agaru pomocí laboratorních vah a zalito 250 ml připraveným MS médiem. Médium bylo vysterilizováno v autoklávu spolu s ostatními předem připravenými pomůckami na výsev (párátka na setí, špičky, skleněné Petriho misky vystlané filtračním papírem).

3.4.2 Výsev rostlin *A. thaliana*

Výsev byl prováděn ve sterilním prostředí ve flowboxu. Následně bylo vyautoklávované médium rovnoměrně rozlito do sterilních čtvercových plastových Petriho misek a necháno zatuhnout. Před začátkem setí byly v mikrozkuhavce vysterilizována semena *A. thaliana* pomocí sterilizačního roztoku (70% ethanol + Tween20), která byla poté vyseta pomocí párátka na agarovou plotnu plastové Petriho misky ve třech řadách po 20-30 semínech. Tímto způsobem byly připraveny pro všechny tři odlišné typy světelných podmínek 3 biologické plikáty. Po dokončení setí byly Petriho misky oblepeny páskou, aby se zabránilo kontaminaci a připravené misky byly ponechány dva dny v lednici při teplotě 4 °C.

3.4.3 Kultivace rostlin ve fytotronu

Po dvou dnech v lednici (4 °C) byly vyseté Petriho misky přeneseny do fytotronu, kde byly umístěny do stojanů ve vertikální poloze. Pro kultivaci byly nastaveny podmínky na 21 °C a 50% relativní vlhkost. Pro jednotlivé sady vzorků byly nastaveny odlišné světelné podmínky. Pro první biologický triplikát vzorků byly nastavené světelné podmínky na 8 h světla a 16 h tmy, pro druhou trojici vzorků 12 h světla a 12 h tmy a poslední trojice byla pěstována při 16 h světla a 8 h tmy.

3.4.4 Sklizení rostlinné materiálu

10denní semenáčky *A. thaliana* byly sklizeny uprostřed denní fáze daných světelných podmínek (pro podmínky 8h/16h ve 4. hodině denní fáze, pro 12/12h byly sklizeny v 6. hodině denní fáze, a pro podmínky 16/8h v 8 hodině denní fáze). Při sklizni byly semenáčky očištěny destilovanou vodou, osušeny a ihned zamrazeny pomocí tekutého dusíku. Mikrozkušavky s rostlinným materiálem byly rychle uskladněny v hlubokomrazícím boxu při -70 °C.

3.5 Příprava vzorků pro analýzu cytokininů

3.5.1 Příprava vzorků

Vzorky vytažené z hlubokomrazícího boxu byly uchovávány po celou dobu pod tekutým dusíkem. Zmrazený rostlinný materiál byl v třecí misce za pomoci tekutého dusíku zhomogenizován. Následně bylo na analytických vahách rozváženo přibližně/přesně 1,5 mg rostlinného materiálu do 2ml mikrozkušavek na technický triplikát. Z každého biologického opakování byly vytvořeny tři technické plikáty pro jednotlivé světelné podmínky (8/16, 12/12, 16/8) a zároveň pro čtyři roční období (jaro, léto, podzim, zima).

3.5.2 Extrakce rostlinného materiálu

Do mikrozkušavek s homogenizovaným rostlinným materiálem byly vloženy tři homogenizační kuličky a bylo přidáno 0,5 ml vychlazeného modifikovaného Bielskíeho pufru a 10 µl směsi interního standardu cytokininů (0,2 pmol B, R, 9G; 0,2 pmol 7G; 0,5 pmol OG, 0,5 pmol NT). Jako technické blanky byly připraveny 2ml mikrozkušavky obsahující pouze modifikovaný Bielskíeho pufr a interní standardy. Vzorky byly řádně promíchány na vortexu a přeneseny na kulový mlýnek, kde proběhla další homogenizace při frekvenci 27 Hz po dobu 5 minut. Vzorky byly extrahovány za pomoci laboratorního rotátoru (17 rpm) po dobu 30 minut při 4 °C. Po extrakci byly vzorky centrifugovány 10 minut (20 000 rpm) při 4 °C a odebrané supernatanty byly přepipetovány do nových 1,5ml mikrozkušavek.

3.5.3 Purifikace rostlinného materiálu

Pro purifikaci rostlinného materiálu byla použita StageTip purifikace. Na přípravu StageTypů byly použity 200µl pipetovací špičky naplněny 3 vrstvami od každého sorbentu C18 (reverzní fáze), SDB (styrendivinybenzen) a Cation-SR (iontoměnič) (Svačinová *et al.*, 2012). Aktivace StageTipů byla provedena 50 µl acetonu s následnou centrifugací (2200 rpm; 4 °C; 10 minut) a 50 µl methanolu za stejných centrifugačních podmínek. Pro přechod mezi aktivačním a kondicionačním krokem bylo

použito 50 µl redestilované vody (2500 rpm; 4 °C; 15 minut). Samotná kondicionace proběhla pomocí 50 µl 50% HNO₃, následována opětovným promytím 50 µl redestilované vody (2800 rpm; 4 °C; 20 minut). Pro lepší zachycení cytokininových metabolitů byly ještě StageTipy promyty 50 µl Bieleckieho pufru (2800 rpm; 4 °C; 20 minut) na získání stejných nanášecích podmínek. Vzorky byly opakovaně nanášeny při centrifugačních podmínkách 4500 rpm, 4 °C, po dobu 30 minut a následně promyty 50 µl methanolu (4500 rpm; 4 °C, 20 minut). Po nanášení a promytí vzorků byly vyměněny spodní části 2ml mikrozkušavek za nové spodní díly 1,5ml mikrozkušavek. Následovala eluce provedená 50 µl 0,5M hydroxidem amonným v 60% methanolu s centrifugací za stejných podmínek jako v předchozím kroku. Získané eluáty byly převedeny do skleněných vialek s vloženými 100µl inzerty a na vakuové odparce byly vzorky odpařeny do sucha. Pro analýzu vzorků pomocí UHPLC-MS/MS metody byly vzorky rozpuštěny ve 30 µl 10% methanolu.

3.6 Identifikace a stanovení cytokininů

Cytokiny byly identifikovány a stanoveny použitím ultra-vysokoúčinné kapalinové chromatografie v tandemovém zapojení s hmotnostním spektrometrem (UHPLC-MS/MS) vybaveným trojitým kvadrupólem (QqQ) s ionizací pomocí elektrospreje (ESI). Podmínky separace pro UHPLC byly podle Svačinová *et al.* (2012), avšak s upraveným nastavením chromatografického gradientu. Na chromatografickou kolonu s reverzní fází Acquity UPLC[®] BEH Shield, RP18 (1,7 µm, 2,1 x 150 mm) bylo nastříknuto 10 µl vzorku a následně bylo odseparováno na základě gradientové eluce 27 isoprenoidních a 20 aromatických cytokininů. Pro separaci cytokininů byl použit gradient tvořen methanolem (A) a 15mM mravenčanem amonným o pH 3,95 (B): 0 min, 5:95 (A:B) – 4 min isokratická eluce, 5:95 (A:B) – 10 min lineární gradient, 20:80 (A:B) – 15 min lineární gradient, 50:50 (A:B) – 15.50 min, 99:1 (A:B) – 16.00 min, 99:1 (A:B) – 16.50 min, 5:95 (A:B) – 17.00 min, 5:95 (A:B). Rychlost průtoku byla nastavena na 0,400 ml/min a teplota kolony na 55 °C. Na konci gradientu byla kolona promyta 100% methanolem a znovu kondicionována na původní podmínky (Svačinová *et al.*, 2012).

Odseparované cytokiny byly detekované pomocí tandemové hmotnostní spektrometrie (MS/MS) za pomoci ionizace elektrosprejem v režimu ESI+ a analyzovány pomocí trojitého kvadrupólu. Jednotlivé retenční časy separovaných cytokininů byly sledovány ve 4 MRM („multiple reaction monitoring“) oknech: 6.00 – 10.30 minut, 10.30 – 12.60 minut, 12.60 – 13.80 minut, 13.80 – 15.20 minut. Nastavení parametrů pro MS/MS bylo následující: teplota zdroje 150 °C; teplota desolvatačního plynu 600 °C; průtok desolvatačního plynu 600 l/h; napětí v kapiláře 0,75 kV (Novák *et al.*, 2008).

Vyhodnocení výsledků bylo provedeno pomocí softwaru MassLynx s použitím metody standardního isotopového ředění a kvantifikovány pomocí programu TargetLynx. Výsledkem byl

získaný poměr endogenních cytokininů, který byl dále využit pro kvantifikaci endogenních hladin cytokininů, jenž byl založen na známé koncentraci značených interních standardů (Plačková *et al.*, 2015).

4 VÝSLEDKY

Výsledkem praktické části bakalářské práce bylo stanovení endogenních hladin cytokininů pomocí UHPLC-MS/MS z 10denních semenáčků modelové rostliny *A. thaliana*, kde byly detekovány isoprenoidní cytokinininy *tZ*-typu (*tZ*, *tZR*, *tZ7G*, *t79G*, *tZOG*, *tZROG*, *tZR5'MP*), *cZ*-typu (*cZ*, *cZR*, *cZ7G*, *c79G*, *cZOG*, *cZROG*, *cZR5'MP*), DHZ-typu (DHZ7G, DHZ9G, DHZOG, DHZROG) a iP-typu (iP, iPR, iP7G, iP9G iP5'MP). Aromatické cytokinininy v semenáčcích *A. thaliana* nebyly detekovány.

Z celkových množství jednotlivých typů cytokininů byly nejvyšší hladiny stanoveny u iP-typu (42,93 – 71,26 pmol/g FW), oproti tomu nejnižších hladin bylo dosaženo u DHZ-typu (3,37 – 8,31 pmol/g FW), kde velká část jejich metabolitů spadala pod limit detekce (LOD).

Porovnání hladin aktivních cytokininů B+R (volné báze + ribosidy), *N*-glukosidů (NG), *O*-glukosidů (OG) a nukleotidů (NT) v průběhu jednotlivých ročních období (obr. 2) prokázaly, že nejvyšší koncentrační hladiny byly dosaženy u *N*-glukosidů (18,2 – 28,2 pmol/g FW), což odpovídalo 62,16 % z celkového množství cytokininů *tZ*-typu. Další hojně zastoupené metabolity byly *O*-glukosidy (4,5 – 7,4 pmol/g FW), které tvořily 16,56 %. Nejnižších hladin bylo dosaženo u aktivních cytokininů, a to pouze ze 7,79 %.

Mezi jednotlivými ročními obdobími byly nejvyšší hladiny aktivních cytokininů *tZ*-typu (*tZ*, *tZR*) detekovány na podzim (2,2 – 5,2 pmol/g FW), naopak nejnižších hladin bylo dosaženo v jarním období (1,3 – 2,6 pmol/g FW).

U *N*-glukosidů (*tZ7G*, *tZ9G*) byly nejvyšší koncentrační hladiny zaznamenány na podzim (22,7 – 28,2 pmol/g FW) a v zimě (20,6 až 22,8 pmol/g FW), kdežto k jejich poklesu došlo na jaře a v létě, kdy se hodnoty pohybovaly v rozmezích 18,2 – 23,8 pmol/g FW. *N*-glukosidy představují zásobní formu cytokininů, což může ovlivňovat nárůst jejich hladin právě v těchto dvou ročních období.

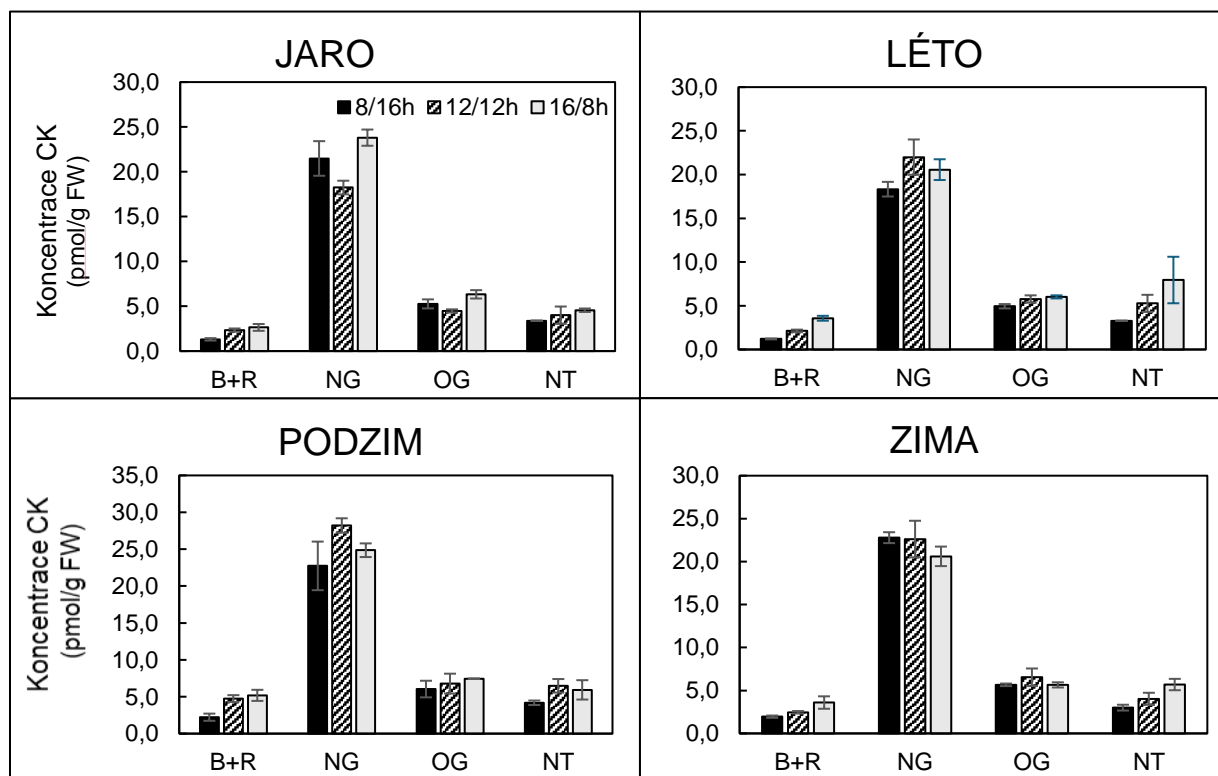
Stejně jako u *N*-glukosidů i *O*-glukosidy (*tZOG*, *tZROG*) opisují stejný průběh trendu vyššími endogenními hladinami právě na podzim (6,0 – 7,4 pmol/g FW) a v zimě (5,6 – 6,5 pmol/g FW) a nižšími hladinami v jarních a letních měsících. Na jaře koncentrace hladin dosahovaly hodnot v rozmezí 4,5 – 6,3 pmol/g FW a v létě 4,9 až 6,0 pmol/g FW. *O*-glukosidy mohou také sloužit jako zásobní látky pro rostlin.

U *tZR5'MP* byl pozorován nárůst v období léta s hodnotami 3,3 až 7,9 pmol/g FW a naopak v jarních měsících byl zaznamenán jejich pokles na 3,4 – 4,6 pmol/g FW v závislosti na světelných podmínkách. Přítomnost nukleotidů v průběhu všech ročních období souvisí s jejich významnou rolí při biosyntéze.

Studiem a porovnáním detekovaných hladin jednotlivých metabolitů cytokininů *tZ*-typu mezi délkami světelných a temnostních fází bylo dosaženo nejvyšších hladin při 16h/8h na jaře a ve většině případů i během letních měsíců. Výjimky během letního období představovaly *N*-glukosidy, kdy nejvyšší hladiny byly detekovány při podmínkách růstu 12h/12h. Výjimka byla potvrzena i v zimním období, ale to u světelné fáze 8h/16h. V tomto ročním období dosahovaly nejvyšších hladin *O*-glukosidy

za podmínek 12h/12h. Na podzim bylo odlišných hodnot dosaženo u *N*-glukosidů a nukleotidů, kdy pro obě formy platilo, že dosahovaly maxim při světelných podmínkách růstu 12h/12h.

Při světelných podmínkách 8h/16h byly nejnižší hladiny detekovány u všech forem metabolitů s výjimkou zimy, kdy byly za těchto podmínek dosaženy nejvyšší hladiny u *N*-glukosidů a jara s nižší hladinou při světelných podmínkách 12h/12h. Ve většině případů se koncentrační hladiny jednotlivých metabolitů *tZ*-typu pohybovaly ve středních hodnotách pro světelné podmínky 12h/12h oproti dvou výše uvedeným.



Obr. 2: Porovnání endogenních hladin cytokininů *tZ*-typu (B+R, NG, OG, NT) v jednotlivých ročních období (jaro, léto, podzim, zima) v 10denních semenáčcích *A. thaliana* pěstovaných při světelných podmínkách: 8h světlo/16h tma (8h/16h), 12h světlo/12h tma (12h/12h), 16h světlo/8h tma (16h/8h). Výsledky jsou uvedeny ve formátu průměr±směrodatná odchylka, n = 3.

Dalšími porovnávanými parametry byly detekované endogenní hladiny jednotlivých metabolitů *cZ*-typu (Obr. 3). Celkově nejvyšších hladin bylo dosaženo stejně jako u *tZ*-typu u *N*-glukosidů (8,1 – 14,8 pmol/g FW), které představují 45,36 % z celkového množství. Druhým hojně zastoupeným metabolitem byl *cZR5*MP pohybující se v rozmezí 5,0 – 13,2 pmol/g FW, což činí 25,9 %. Nižší hladiny byly detekovány u aktivních cytokininů (1,8 – 8,2 pmol/g FW) představující 17,94 % a pouhých 9,1 % tvořily *O*-glukosidy, čímž jsou označeny za nejméně zastoupenou formu cytokininů *cZ*-typu.

Při porovnávání jednotlivých dosažených koncentračních hladin v průběhu čtyř ročních období byly nejvyšší hodnoty aktivních cytokininů zjištěny na podzim (s hladinami 4,8 – 8,2 pmol/g FW) a na

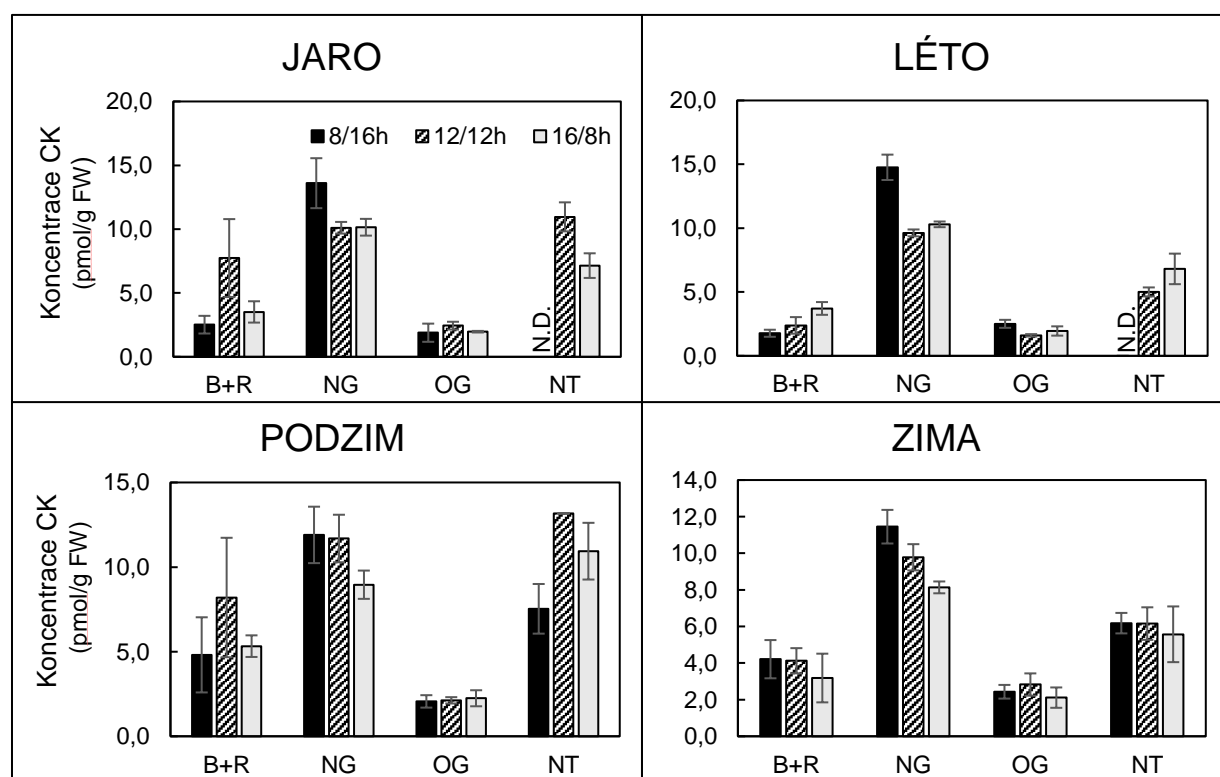
jaře (2,5 - 7,7 pmol/g FW), přičemž k mírnému poklesu došlo v zimním období (3,2 – 4,2 pmol/g FW) a nejnižší koncentrační hladiny byly detekovány v létě (1,8 – 3,7 pmol/g FW).

Nejhojněji zastoupené metabolity v průběhu celého roku představovaly opět *N*-glukosidy (*cZ7G*, *cZ9G*) s nejvyššími hladinami detekovanými v létě a na jaře (9,6 – 14,8 pmol/g FW). Nejvyšší pokles byl zaznamenán v zimním období (8,1 – 11,5 pmol/g FW).

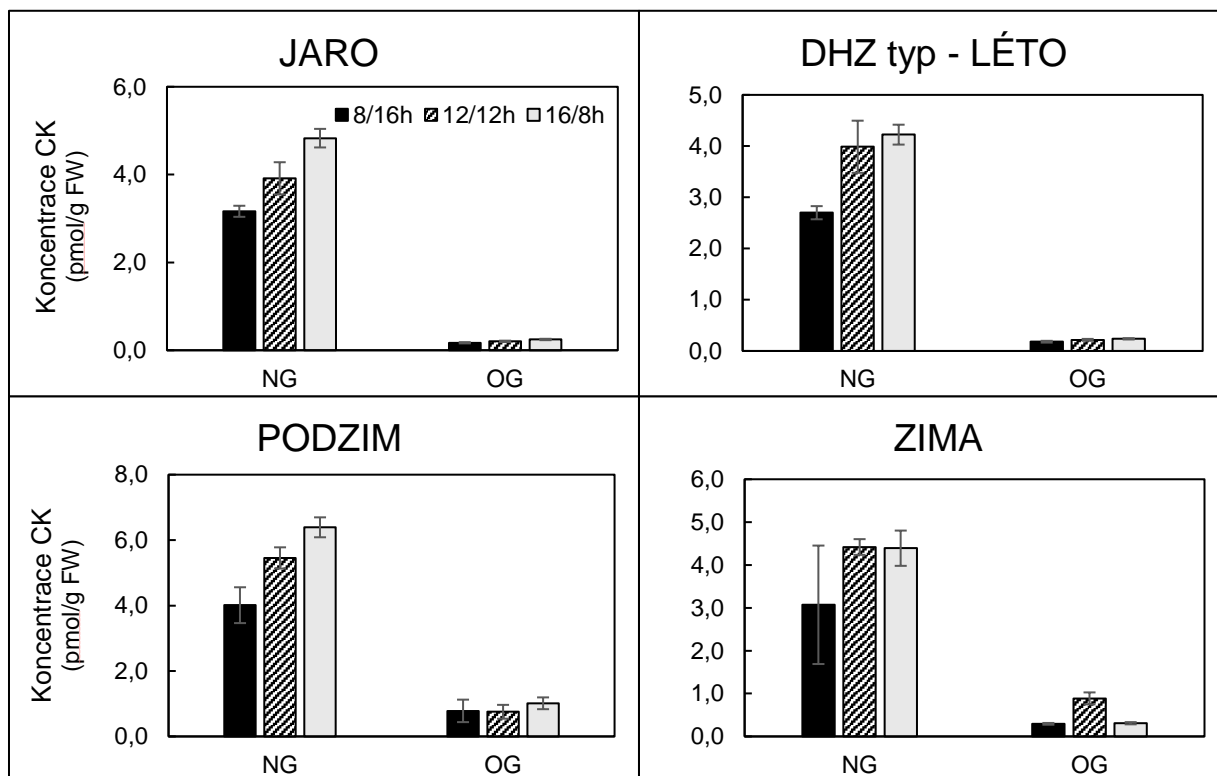
O-glukosidy (*cZOG*, *cZROG*) byly detekovány v nejmenší míře a jejich koncentrační hladiny se pohybovaly na stejných úrovních v průběhu celého roku.

Druhou nejčastěji zastoupenou formou cytokininů *cZ*-typu představuje *cZR5'MP*, jehož role souvisí s biosyntézou. Nejvyšší hladiny tohoto metabolitu byly zjištěny na podzim (7,5 – 13,2 pmol/g FW) s mírným poklesem zaznamenaným na jaře (7,1 – 11,0 pmol/g FW). Nejnižších hladin bylo dosaženo v zimním a letním období s hladinami v rozmezí (5 – 6,8 pmol/g FW).

Vliv délky fotoperiody byl porovnáván i v rámci *cZ*-typu. Během světelných podmínek 16h/8h byly nejvyšší hladiny zaznamenány pouze v letním období u *cZR5'MP* a aktivních cytokininů. Během podzimu byly zvýšeny hladiny *O*-glukosidů, ostatní metabolity za těchto světelných podmínek dosahovaly nižších koncentrací. V zimě bylo při těchto světelných podmínkách dosaženo nejnižších hladin u všech metabolitů *cZ*-typu. Pro tento typ cytokininů bylo nejvyšších hladin všeobecně dosaženo právě během světelných podmínek 8h/16h a nejnižších při podmínkách 16h/8h.



Obr. 3: Porovnání endogenních hladin cytokininů **cZ**-typu (B+R, NG, OG, NT) v jednotlivých ročních období (jaro, léto, podzim, zima) v 10denních semenáčcích *A. thaliana* pěstovaných při světelných podmínkách: 8 h světlo/16 h tma (8/16h), 12 h světlo/12 h tma (12/12h), 16 h světlo/8 h tma (16/8h). Uvedeny průměry±směrodatná odchylka, n = 3, N.D. = nebylo detekováno



Obr. 4: Porovnání endogenních hladin cytokininů **DHZ-typu** (B+R, NG, OG, NT) v jednotlivých ročních obdobích (jaro, léto, podzim, zima) v 10denních semenáčcích *A. thaliana* pěstovaných při světelných podmínkách: 8 h světlo/16 h tma (8/16h), 12 h světlo/12 h tma (12/12h), 16 h světlo/8 h tma (16/8h). Uvedeny průměry ± směrodatná odchylka, n = 3.

Dihydrazeatinové metabolity představují cytokinininy s nejnižšími detekovanými hladinami v rámci celkového zastoupení všech cytokininových typů. U této formy nebyly detekovány jak aktivní cytokinininy, tak ani jeho příslušný nukleotid DHZR5'MP. Porovnávány byly pouze hladiny zásobních forem, *N*-glukosidů a *O*-glukosidů.

Nejvyšších koncentračních hladin, stejně jako u všech prozatím porovnávaných typů cytokininů (*tZ*- a *cZ*-typu), bylo dosaženo u *N*-glukosidů (2,7 – 6,4 pmol/g FW), což činilo 90,52%. Zbýlých 9,48 % odpovídalo přítomnosti *O*-glukosidů.

U DHZ7G a DHZ9G v průběhu roku nedošlo k významným změnám, pouze k mírnému nárůstu v podzimním období (4,0 - 6,4 pmol/g FW).

U *O*-glukosidů (DHZOG, DHZROG) můžeme pozorovat mírný nárůst v podzimním (0,8 – 1,0 pmol/g FW) a zimním období (0,3 – 0,9 pmol/g FW) a pokles na jaře a v létě (0,2 pmol/g FW), což by mohlo odpovídat vytváření zásob v těchto obdobích.

Při porovnávání vlivu délky světelné a temnostní fáze na endogenní hladiny jednotlivých cytokininů DHZ-typu se ukázalo, že podmínky s nejdelší denní fází, tedy 16h/8h, dosahují nejvyšších koncentračních hladin u *N*-glukosidů během všech sledovaných ročních období a naopak během

světelných podmínek s nejkratší denní fází je dosaženo nejnižších hladin. U *O*-glukosidů byly udržovány téměř konstantní hladiny během všech ročních období, výjimku představovala pouze zima, kde nejvyšší hladiny dosáhly maxima během světelných podmínek 12h/12h.

Nejzastoupenější formou ze všech cytokininů představuje **iP-typ**, u kterého byly detekovány nejvyšší hladiny u iPR5'MP (16,7 – 39,0 pmol/g FW). Tyto získané koncentrační hladiny dosahovaly nejvyšších hodnot v rámci nukleotidů v doposud porovnávaných typech cytokininů. Během čtyř ročních období byly porovnávány hladiny aktivních forem, *N*-glukosidů a iPR5'MP. 42,1 % z celkového množství cytokininů iP typu představovaly *N*-glukosidy (15,3 – 28,6 pmol/g FW) a nejnižší hladiny byly zjištěny u aktivních cytokininů (1,8 – 6,1 pmol/g FW), což odpovídalo pouhým 6,94 % z celkových cytokininů iP-typu.

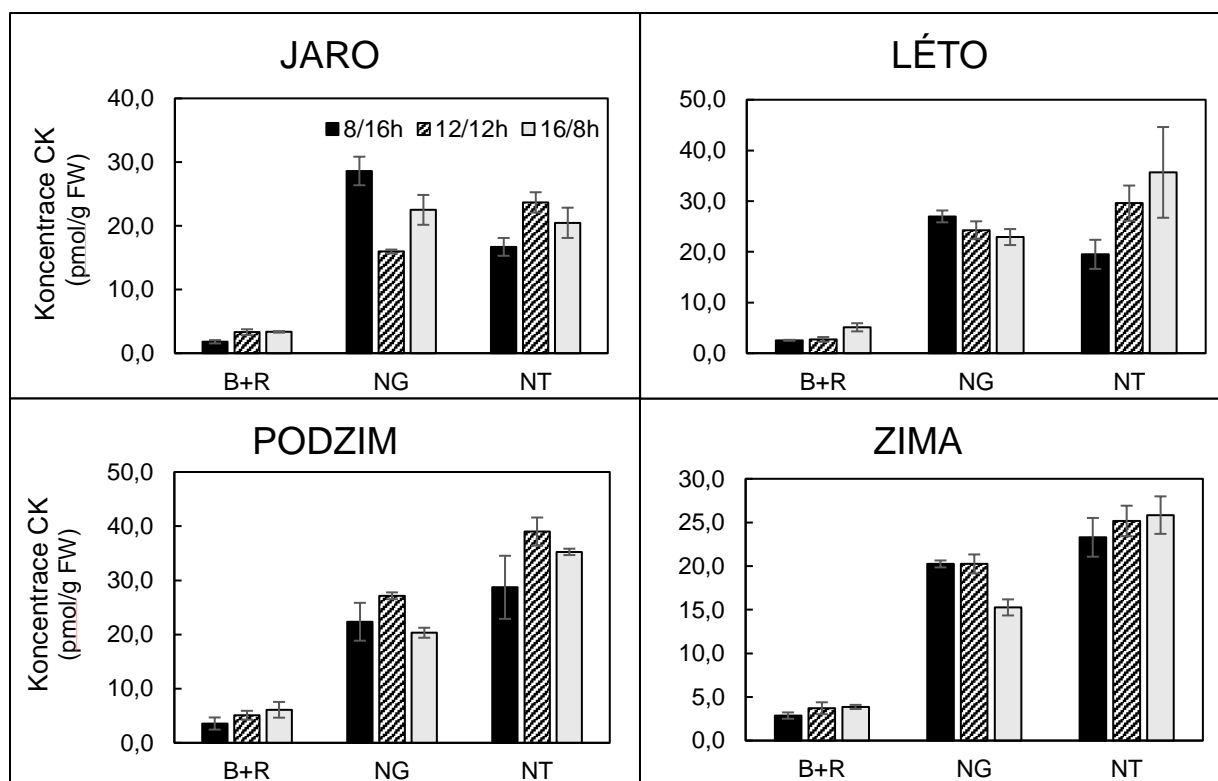
U aktivních cytokininů (iP, iPR) byly nejnižší hladiny detekovány na jaře (1,8 – 3,3 pmol/g FW), zatímco nejvyšších koncentrací bylo dosaženo na podzim (3,6 – 6,1 pmol/g FW). V létě a v zimě nebylo pozorováno značné kolísání v hladinách detekovaných cytokininů, a proto jsou jejich hladiny téměř srovnatelné a pohybují se v rozmezí 2,5 – 5,1 pmol/g FW.

U *N*-glukosidů (iP7G, iP9G) byl nejvyšší trend hladin pozorován během léta a podzimu ($\pm 20,3$ – 27,1 pmol/g FW) s jeho mírným poklesem na jaře a s nejnižšími hladinami dosaženými v zimním období (15,3 – 20,2 pmol/g FW).

Během roku byly nejvyšší hladiny iPR5'MP detekovány na podzim (28,7 – 39,0 pmol/g FW) s mírným poklesem hodnot v letním a zimním období. Nejvýraznější snížení hladin bylo detekováno v jarních měsících (16,7 – 23,7 pmol/g FW).

Nejvyšších hladin v rámci porovnávání jednotlivých světelných podmínek u iP-typu cytokininů bylo ve většině případů dosaženo při stejně dlouhé denní a noční fázi. Výjimku představoval iPR5'MP v letních a v zimních měsících, při kterých nejvyšší hladiny dosahovaly maxima za podmínek s nejdelší denní fází (16h/8h).

N-glukosidy dosáhly svého maxima při podmínkách s nejkratší denní fází (8h/16h) v jarním a letním období. Koncentrační hladiny aktivních forem cytokininů získané při světelných podmínkách 12h/12h a 16h/8h byly během celého roku velmi podobné kromě mírného vzrůstu hodnot během podzimních měsíců při podmínkách 16h/8h. Pro iPR5'MP a aktivní formy cytokininů platilo, že nejnižší získané koncentrační hladiny byly detekovány za podmínek 8h/16h v průběhu celého roku.



Obr. 5: Porovnání endogenních hladin cytokininů **iP**-typu (B+R, NG, OG, NT) v jednotlivých ročních období (jaro, léto, podzim, zima) v 10denních semenáčcích *A. thaliana* pěstovaných při světelných podmínkách: 8 h světlo/16 h tma (8/16h), 12 h světlo/12 h tma (12/12h), 16 h světlo/8 h tma (16/8h). Uvedeny průměry±směrodatná odchylka, n = 3.

5 DISKUZE

Jedním z přístupů při studiu role cytokininů při kvetení rostlin bylo sledování změn jejich endogenních hladin u krátkodenních (Henson a Wareing et al., 1974; Henson a Wareing et al., 1977a,b,c) a dlouhodenních (Lejeune et al., 1988) rostlin. Další studie se zabývaly vlivem ročního období na endogenní hladiny cytokininů (Gebauerová, 2020). Cílem této práce bylo zjistit, zda roční období (jaro, léto, podzim, zima) a rozdílná fotoperioda (8h/16h, 12h/12h, 16h/8h) ovlivňují endogenní hladiny cytokininů v rostlinách.

Při porovnání celkového množství jednotlivých typů cytokininů byl za nejhojněji se vyskytující iP-typ, následován tZ-typem. Převaha těchto dvou forem v rostlinách byla již dříve zmíněna Lethamem (Letham, 1963) a souvisí s jejich biologickou aktivitou. Nejmenší podíl tvořily cytokininy DHZ-typu, u kterých byly detekovány pouze zásobní formy, tedy *N*-glukosidy (DHZ7G, DHZ9G) a *O*-glukosidy (DHZOG, DHZROG), které během roku nevykazovaly žádné značné kolísání. Ostatní formy byly pod

limitem detekce. DHZ-typ není využíván pro syntézu jiných cytokininových metabolitů a dosahuje vyšší stability díky jeho schopnosti odolávat působení cytokinin oxidázy/dehydrogenázy. Výsledné porovnání hladin všech jednotlivých typů cytokininů odpovídá již dříve publikovaným pracím (Gebauerová, 2020; Cermanová, 2020), ve kterých byly použity, stejně jako v naší práci, 10denní semenáčky modelové rostliny *A. thaliana*. Avšak podobných výsledků bylo dosaženo i u jiných studií, které se lišily použitým biologickým materiálem. V jednom experimentu byly použity 10-, 11- a 12denní rostliny (Cermanová, 2022), ve druhém 14denní rostliny (Hošek et al., 2020) a ve třetím 4týdenní rostliny *Arabidopsis thaliana* (Šmečilová et al., 2016).

Nejčteněji zastoupeným typem cytokininů v rostlinách *A.thaliana* pěstovaných při třech odlišných světelných režimech (8h/16h, 12h/12h, 16h/8h) byly *N*-glukosidy (*tZ7G*, *tZ9G*, *cZ7G*, *cZ9G*, *DHZ7G*, *DHZ9G*, *iP7G*, *iP9G*). Druhou nejhojněji vyskytující se formou byly nukleotidy (hlavně *cZR5'MP*, *iPR5'MP*). Aktivní cytokininy (*tZ*, *tZR*, *cZ*, *cZR*, *DHZ*, *DHZR*, *iP*, *iPR*) a *O*-glukosidy (*tZOG*, *tZROG*, *cZOG*, *cZROG*, *DHZOG*, *DHZROG*) vykazovaly podobné hladiny při všech světelných podmínkách. Získané koncentrační hladiny *N*-glukosidů odpovídají již dříve prováděným experimentům u *A.thaliana* (Cermanová, 2022; Cermanová 2020; Kocmánková 2020; Gebauerová 2020; Hošek et al., 2020; Šmečilová et al., 2016). U *O*-glukosidů a aktivních forem (B+R) byly detekovány nejnižší koncentrační hladiny v rámci jednotlivých cytokininových typů u všech tří použitých světelných podmínek, což je v rozporu s daty Cermanové (2022), kde *O*-glukosidy a aktivní cytokininy tvořily druhé nejčteněji zastoupené formy cytokininů. U výsledků uváděných v práci Gebauerová (2020) dosahovaly aktivní cytokininy vyšších koncentračních hladin než nukleotidy, což je v rozporu s hladinami získanými během našich experimentů. U nás se trend nukleotidů versus aktivních cytokininů otočil.

Zásobní formy *N*- a *O*-glukosidů tvořily nejvíce zastoupenou část ze všech detekovaných metabolitů cytokininů. Nejvyšších koncentrací *N*-glukosidů bylo naměřeno u *iP*-typu, u kterých byly hladiny vyšší než koncentrace naměřené u *tZ*- a *cZ*- typu, což je v souladu s Hošek *et al.* (2020). *N*-glukosidy *iP*-typu dosáhly těchto vysokých hodnot během letního, podzimního a jarního období, přičemž v jarních a letních měsících byly nejvyšší hodnoty detekovány za podmínek 8h/16h a na podzim při podmínkách 12h/12h. Zatímco u *tZ*-typu byly nejvyšší hladiny u *N*-glukosidů dosažené při podmínkách 12h/12h (podzim), 8h/16h (zima) a 16h/8h (jaro), u *cZ*-typu bylo nejvyšších hladin dosaženo vždy při podmínkách 8h/16h. Tím se získané parametry liší od hodnot podle Cermanová (2022), kde nejvyšší zastoupení měly *N*-glukosidy *iP*-typu na jaře, v létě a v zimě při podmínkách 16h/8h a 12/12h, zatímco *N*-glukosidy *tZ*-typu u stejných ročních období převládaly při světelných podmínkách 8h/16h.

Výsledné parametry získané během jednotlivých ročních období poukazují na skutečnost, že světlo je jeden z velmi důležitých prvků, který stimuluje biosyntézu cytokininů *iP*-typu, což už bylo popsáno u listů *A.thaliana* (Janečková *et al.*, 2018).

Jedním z cílů bylo stanovit jednotlivé endogenní hladiny cytokininů během čtyř ročních období a zjistit, zda mají sezónní změny vliv na biosyntézu různých forem cytokininů. Díky předchozím experimentům zaměřeným na zjištění vlivu jednotlivých ročních období bylo prokázáno podle Gebauerová (2020), že v průběhu roku se liší jak zastoupení jednotlivých typů cytokininů, tak i detekované hladiny jejich metabolitů. V této studii byly během jara a léta naměřeny vyšší koncentrační hladiny jednotlivých cytokininových metabolitů, zatímco na podzim docházelo k jejich poklesu. Námí provedený experiment tuto skutečnost nepotvrzuje. Během našeho experimentu byly nejvyšší naměřené endogenní hladiny právě během podzimního a zimního období u všech cytokininových typů. Tedy v období, kdy si rostliny vytvářejí zásoby potřebné k přečkání nepříznivých vlivů. Avšak naše poznatky potvrzují data získané v práci Cermanová (2022), v níž vyšší hladiny v rámci ročního období byly stejné jako u nás v podzimním a zimním období.

Jedním z výstupů studie Cermanová (2022) bylo, že při podmínkách s nejdelší světelnou fází (16h/8h) dosáhly nejvyšších hladin aktivní cytokinininy (báze + ribosidy) a naopak při podmínkách s nejkratší světelnou fází (8h/16h) byly nejvyšší hodnoty u zásobních forem (*N*- a *O*-glukosidů). Výsledky získané našimi experimenty se s těmito výstupy ne vždy shodovaly a získaná data vykazují spíše opačný trend, během kterého ne vždy bylo získáno nejvyšších hladin u světelných podmínek 16h/8h. Data získaná při režimu 8h/16h byla v souladu s prací.

Čím delší je fotoperioda, tím vyšší by měly být detekované hladiny endogenních cytokininů, a naopak čím kratší je délka fotoperiody, tím by měly být dosažené koncentrační hladiny nižší (Cermanová, 2022). U *tZ*- a *DHZ*-typů tento předpoklad platil, u *cZ*- a *iP*-typu tomu tak nebylo. Nejvyšších hladin bylo často dosaženo právě při podmínkách s kratší denní fází (8h/16h) a naopak nižších koncentračních hladin bylo naměřeno při podmínkách s delší fotoperiodou (16h/8h). U rostlin pěstovaných při podmínkách 12h/12h bylo dosaženo průměrných hodnot, a to jak s ohledem na zastoupení jednotlivých typů cytokininů, tak i na dosažené koncentrační hladiny, což je v souladu se studií Cermanová (2022).

Důvodem, proč bylo dosaženo opačných výsledků, než se předpokládalo, může být biologická variabilita rostlin. Záležet by mohlo i na genetických variacích, fázi růstu a stupni vývoje zkoumané rostliny. Zároveň rostliny mohou vykazovat i určitý stupeň fyziologické adaptace, který může ovlivňovat endogenní hladiny cytokininů na základě svých potřeb pro růst a vývoj. Vliv světelných podmínek může být však i překryt interakcí s jinými faktory, kterými mohou být např. teplota, vlhkost nebo živiny.

6 ZÁVĚR

Cytokininů se řadí mezi rostlinné fytohormony a podílejí se na významných fyziologických procesech v rostlinách ovlivňující nejen jejich růst, ale i vývoj. Nezbytnou roli hrají např. vývoji prýtů a kořenů, při klíčení semen a nedílnou součástí je i účast při apikální dominanci a senescenci.

Cílem bakalářské práce bylo stanovení endogenních hladin cytokininů v semenáčcích *A. thaliana* pěstované při odlišných světelných podmínkách (8h/16h, 12h/12h, 16h/8h) během čtyř ročních období (jaro, léto, podzim, zima). Modelové rostliny byly pěstovány na MS médiu ve fytotronech za pevně regulovaných podmínek. 10denní semenáčky byly dále zpracovány pomocí účinné a cenově dostupné purifikační metody StageTip a následně byly detekovány endogenní hladiny cytokininových typů a jejich metabolitů za použití ultra-vysokoúčinné kapalinové chromatografie v zapojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií (UHPLC-MS/MS).

Na základě výsledků vycházejících z experimentální části této práce byla částečně potvrzena hypotéza vlivu délky světelné a temnostní fáze na detekované hladiny endogenních cytokininů. Nejvyšších koncentračních hladin bylo ve většině případů dosaženo během světelného režimu 16h/8h, zatímco nejnižší koncentrační hladiny byly detekovány při podmínkách 8h/16h a průměrných hodnot dosahovaly hladiny získané během světelného režimu se stejně dlouhou světelnou a temnostní fází (12h/12h).

Zároveň byl zjišťován i vliv různých ročních období na hladiny jednotlivých cytokininů, kdy bylo zjištěno, že nejvyšší koncentrační hladiny všech cytokininových typů byly během podzimních měsíců, a naopak nejnižších hladin bylo dosaženo na jaře. V průběhu celého roku značně převažovaly zásobní formy cytokininů, konkrétně *N*-glukosidy, následované nukleotidy. Role nukleotidů je spojována s biosyntézou cytokininů, jelikož představují jejich prvotní produkty a následně procházejí celou řadou biologických přeměn mezi jak jednotlivými metabolity (např. nukleosidy a volné báze), tak i mezi jednotlivými typy cytokininů (Hošek *et al.*, 2019).

Výstupy z této, ale i z předchozích studií zabývající se odlišným vlivem různých světelných podmínek na endogenní hladiny cytokininů v rostlinách, potvrdily klíčovou roli světelného záření na základní rostlinné biologické procesy, jako jsou fotosyntéza, vitalita, růst a vývoj rostlin. Ovšem měnící se světelné podmínky nebyly jediným faktorem podílejícím se na ovlivnění výše zmíněných biologických procesů. I když byly rostliny pěstovány za přísně regulovaných podmínek ve fytotronu, jejich endogenní hladiny cytokininů vykazovaly rozdílné hodnoty v závislosti na ročním období. Získaná data mohou dále sloužit k rozvinutí biologického chápání rostlin, což by mohlo být využito při nastavování vhodných podmínek pro pěstování hospodářských rostlin a tím zvýšení jejich úrody a výnosu.

7 POUŽITÁ LITERATURA

- Abe, I., Tanaka, H., Abe, T., & Noguchi, H. (2007). Enzymatic formation of unnatural cytokinin analogs by adenylate isopentenyltransferase from mulberry. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 355, 795–800.
- Ahmad, M., Jarillo, J. A., & Cashmore, A. R. (1998b). Chimeric proteins between cry1 and cry2 Arabidopsis blue light photoreceptors indicate overlapping functions and varying protein stability. *The Plant cell*, 10(2), 197–207.
- Ahmad, M., Jarillo, J. A., Smirnova, O., & Cashmore, A. R. (1998a). The CRY1 blue light photoreceptor of Arabidopsis interacts with phytochrome A in vitro. *Molecular cell*, 1(7), 939–948.
- Akhtar, S. S., Mekureyaw, M. F., Pandey, C., & Roitsch, T. (2020). Role of Cytokinins for Interactions of Plants With Microbial Pathogens and Pest Insects. *Frontiers in plant science*, 10, 1777.
- Akiyoshi, D. E., Klee, H., Amasino, R. M., Nester, E. W., & Gordon, M. P. (1984). T-DNA of *Agrobacterium tumefaciens* encodes an enzyme of cytokinin biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 81(19), 5994–5998.
- Alabadi, D., Oyama, T., Yanovsky, M. J., Harmon, F. G., Más, P., & Kay, S. A. (2001). Reciprocal regulation between TOC1 and LHY/CCA1 within the Arabidopsis circadian clock. *Science (New York, N.Y.)*, 293(5531), 880–883.
- Ananieva, K., Ananiev, E. D., Doncheva, S., Georgieva, K., Tzvetkova, N., Kamínek, M., Motyka, V., Dobrev, P., Gajdosová, S., & Malbeck, J. (2008). Senescence progression in a single darkened cotyledon depends on the light status of the other cotyledon in Cucurbita pepo (zucchini) seedlings: potential involvement of cytokinins and cytokinin oxidase/dehydrogenase activity. *Physiologia Plantarum*, 134(4), 609–623.
- Anantharaman, V., & Aravind, L. (2001). The CHASE domain: a predicted ligand-binding module in plant cytokinin receptors and other eukaryotic and bacterial receptors. *Trends in biochemical sciences*, 26(10), 579–582.
- Anwer, M. U., & Davis, S. J. (2013). An overview of natural variation studies in the Arabidopsis thaliana circadian clock. *Seminars in cell & developmental biology*, 24(5), 422–429.
- Appleby, J. L., Parkinson, J. S., & Bourret, R. B. (1996). Signal transduction via the multi-step phosphorelay: not necessarily a road less traveled. *Cell*, 86(6), 845–848.
- Argueso, C. T., Ferreira, F. J., Epple, P., To, J. P., Hutchison, C. E., Schaller, G. E., Dangl, J. L., & Kieber, J. J. (2012). Two-component elements mediate interactions between cytokinin and salicylic acid in plant immunity. *PLoS genetics*, 8(1), e1002448. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002448>
- Armstrong D.J. (1994). Cytokinin oxidase and the regulation of cytokinin degradation. In: Cytokinins: Chemistry, Activity, and Function. (Mok D.W.S, Mok M.C., eds.), CRC Press, Florida, 139–54.
- Armstrong, D. J., & Firtel, R. A. (1989). Cytokinin oxidase activity in the cellular slime mold, *Dictyostelium discoideum*. *Developmental biology*, 136(2), 491–499.
- Badenoch-Jones, J., Parker, C. W., Letham, D. S., & Singh, S. (1996). Effect of cytokinins supplied via the xylem at multiples of endogenous concentrations on transpiration and senescence in derooted seedlings of oat and wheat. *Plant Cell Environ.*, 19, 504–516.
- Barciszewski, J., Siboska, G., Clark, B. F. C., & Rattan, S. I. S. (2000). Cytokinin formation by oxidative metabolism. *Journal of Plant Physiology*, 157(5), 587–588. doi: 10.1016/S0176-1617(00)80116-9.
- Bari, R., & Jones, J. D. (2009). Role of plant hormones in plant defence responses. *Plant molecular biology*, 69(4), 473–488.
- Barry, G. F., Rogers, S. G., Fraley, R. T., & Brand, L. (1984). Identification of a cloned cytokinin biosynthetic gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 81(15), 4776–4780.
- Bassil, N. V., Mok, D., & Mok, M. C. (1993). Partial Purification of a cis-trans-Isomerase of Zeatin from Immature Seed of *Phaseolus vulgaris* L. *Plant physiology*, 102(3), 867–872.
- Bauer, D., Viczián, A., Kircher, S., Nobis, T., Nitschke, R., Kunkel, T., Panigrahi, K. C., Adám, E., Fejes, E., Schäfer, E., & Nagy, F. (2004). Constitutive photomorphogenesis 1 and multiple photoreceptors control degradation of phytochrome interacting factor 3, a transcription factor required for light signaling in Arabidopsis. *The Plant cell*, 16(6), 1433–1445.
- Biswal, U. C., & Sharma, R. (1976). Phytochrome regulation of senescence in detached barley leaves. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*, 80, 71–73.
- Blaser, M. J., Cardon, Z. G., Cho, M. K., Dangl, J. L., Donohue, T. J., Green, J. L., Knight, R., Maxon, M. E., Northen, T. R., Pollard, K. S., & Brodie, E. L. (2016). Toward a Predictive Understanding of Earth's Microbiomes to Address 21st Century Challenges. *mBio*, 7(3), e00714-16.
- Borghì, L., Kang, J., Ko, D., Lee, Y., & Martinoia, E. (2015). The role of ABCG-type ABC transporters in phytohormone transport. *Biochemical Society transactions*, 43(5), 924–930.

- Brouwer, B., Ziolkowska, A., Bagard, M., Keech, O., & Gardeström, P. (2012). The impact of light intensity on shade-induced leaf senescence. *Plant, cell & environment*, 35(6), 1084–1098.
- Brownlee, B. G., Hall, R. H., & Whitty, C. D. (1975). 3-Methyl-2-butenal: an enzymatic degradation product of the cytokinin, N-6-(delta-2 isopentenyl)adenine. *Canadian journal of biochemistry*, 53(1), 37–41.
- Brugière, N., Humbert, S., Rizzo, N., Bohn, J., & Habben, J. E. (2008). A member of the maize isopentenyl transferase gene family, *Zea mays* isopentenyl transferase 2 (ZmIPT2), encodes a cytokinin biosynthetic enzyme expressed during kernel development. Cytokinin biosynthesis in maize. *Plant molecular biology*, 67(3), 215–229.
- Brzobohatý, B., Moore, I., Kristoffersen, P., Bako, L., Campos, N., Schell, J., & Palme, K. (1993). Release of active cytokinin by a β -glucosidase localized to the maize root meristem. *Science*.
- Buchanan-Wollaston, V. (1997). The molecular biology of leaf senescence. *Journal of Experimental Botany*, 48(307), 181–199.
- Bürkle, L., Cedzich, A., Döpke, C., Stransky, H., Okumoto, S., Gillissen, B., Kühn, C., & Frommer, W. B. (2003). Transport of cytokinins mediated by purine transporters of the PUP family expressed in phloem, hydathodes, and pollen of Arabidopsis. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 34(1), 13–26.
- Caplin, S. M., & Steward, F. C. (1948). Effect of Coconut Milk on the Growth of Explants From Carrot Root. *Science (New York, N.Y.)*, 108(2815), 655–657.
- Causin, H. F., Jauregui, R. N., & Barneix, A. J. (2006). The effect of light spectral quality on leaf senescence and oxidative stress in wheat. *Plant Science*, 171(1), 24–33.
- Cedzich, A., Stransky, H., Schulz, B., & Frommer, W. B. (2008). Characterization of cytokinin and adenine transport in Arabidopsis cell cultures. *Plant physiology*, 148(4), 1857–1867.
- Cermanová K. (2020) Sledování změn obsahu cytokininů v průběhu dne v semenáčcích *Arabidopsis thaliana*. Bakalářská práce. Olomouc, Univerzita Palackého, Přírodovědecká fakulta, Laboratoř růstových regulátorů.
- Cermanová K. (2022) Vliv délky fotoperiody na obsah cytokininů. Diplomová práce. Olomouc, Univerzita Palackého, Přírodovědecká fakulta, Laboratoř růstových regulátorů.
- Cohen L, Gepstein S, Horwitz BA (1991). Similarity between cytokinin and blue light inhibition of cucumber hypocotyl elongation. *Plant Physiol*, 95, 77–81
- Cortleven, A., Leuendorf, J. E., Frank, M., Pezzetta, D., Bolt, S., & Schmölling, T. (2019). Cytokinin action in response to abiotic and biotic stresses in plants. *Plant, cell & environment*, 42(3), 998–1018.
- Covington, M. F., Maloof, J. N., Straume, M., Kay, S. A., & Harmer, S. L. (2008). Global transcriptome analysis reveals circadian regulation of key pathways in plant growth and development. *Genome biology*, 9(8), R130.
- Crafts-Brandner, S. J., Below, F. E., Wittenbach, V. A., Harper, J. E., & Hageman, R. H. (1984). Differential Senescence of Maize Hybrids following Ear Removal : II. Selected Leaf. *Plant physiology*, 74(2), 368–373.
- Davies, P. J. (2010). The plant hormones: Their nature, occurrence, and functions. In *Plant Hormones: Biosynthesis, Signal Transduction, Action!*
- De Veylder, L., Beeckman, T., Beemster, G. T., Krols, L., Terras, F., Landrieu, I., van der Schueren, E., Maes, S., Naudts, M., & Inzé, D. (2001). Functional analysis of cyclin-dependent kinase inhibitors of Arabidopsis. *The Plant cell*, 13(7), 1653–1668.
- Dijkwel, P. P., Huijser, C., Weisbeek, P. J., Chua, N. H., & Smeekens, S. C. (1997). Sucrose control of phytochrome A signaling in Arabidopsis. *The Plant cell*, 9(4), 583–595.
- Dixon, L. E., Knox, K., Kozma-Bognar, L., Southern, M. M., Pokhilko, A., & Millar, A. J. (2011). Temporal repression of core circadian genes is mediated through EARLY FLOWERING 3 in Arabidopsis. *Current Biology*, 21, 120–125.
- Dobrev, P. I., & Kamínek, M. (2002). Fast and efficient separation of cytokinins from auxin and abscisic acid and their purification using mixed-mode solid-phase extraction. *Journal of Chromatography A*, 950(1–2), 21–29.
- Dodd, A. N., Salathia, N., Hall, A., Kévei, E., Tóth, R., Nagy, F., Hibberd, J. M., Millar, A. J., & Webb, A. A. (2005). Plant circadian clocks increase photosynthesis, growth, survival, and competitive advantage. *Science (New York, N.Y.)*, 309(5734), 630–633.
- Doyle, M. R., Davis, S. J., Bastow, R. M., McWatters, H. G., Kozma-Bognár, L., Nagy, F., Millar, A. J., & Amasino, R. M. (2002). The ELF4 gene controls circadian rhythms and flowering time in Arabidopsis thaliana. *Nature*, 419(6902), 74–77.
- Entsch B., Letham D. S. (1979) Enzymic glucosylation of the cytokinin, 6-benzylaminopurine. *Plant Science Letters* 14, 205-212.
- Eriksson, M. E., & Millar, A. J. (2003). The circadian clock. A plant's best friend in a spinning world. *Plant physiology*, 132(2), 732–738.
- Esberg, B., Leung, H. C., Tsui, H. C., Björk, G. R., & Winkler, M. E. (1999). Identification of the miaB gene, involved in methylthiolation of isopentenylated A37 derivatives in the tRNA of Salmonella typhimurium and Escherichia coli. *Journal of bacteriology*, 181(23), 7256–7265.

- Ezer, D., Jung, J. H., Lan, H., Biswas, S., Gregoire, L., Box, M. S., Charoensawan, V., Cortijo, S., Lai, X., Stöckle, D., Zubieta, C., Jaeger, K. E., & Wigge, P. A. (2017). The evening complex coordinates environmental and endogenous signals in Arabidopsis. *Nature plants*, 3, 17087.
- Fankhauser, C. (2002). Light perception in plants: cytokinins and red light join forces to keep phytochrome B active. *Trends in Plant Science*, 7(4), 143-145.
- Fehér A. (2019). Callus, Dedifferentiation, Totipotency, Somatic Embryogenesis: What These Terms Mean in the Era of Molecular Plant Biology?. *Frontiers in plant science*, 10, 536.
- Feierabend, J., & de Boer, I. (1978). Comparative analysis of the action of cytokinin and light on the formation of RBPC and plastid biogenesis. *Planta*, 142, 75-82.
- Ferreira, F. J., & Kieber, J. J. (2005). Cytokinin signaling. *Current opinion in plant biology*, 8(5), 518–525.
- Flores, S., & Tobin, E. M. (1986). Benzyladenine modulation of the expression of two genes for nuclear-encoded chloroplast proteins in *Lemna gibba*: Apparent post-transcriptional regulation. *Planta*, 168(3), 340–349.
- Folta, K. M., & Childers, K. S. (2008). Light as a Growth Regulator: Controlling Plant Biology with Narrow-bandwidth Solid-state Lighting Systems. *HortScience horts*, 43(7), 1957-1964.
- Foo, E., Morris, S. E., Parmenter, K., Young, N., Wang, H., Jones, A., Rameau, C., Turnbull, C. G., & Beveridge, C. A. (2007). Feedback regulation of xylem cytokinin content is conserved in pea and Arabidopsis. *Plant physiology*, 143(3), 1418–1428.
- Francis D. (2007). The plant cell cycle – 15 years on. *New Phytologist* 174, 261-278.
- Frébort, I., Kowalska, M., Hluska, T., Frébortová, J., & Galuszka, P. (2011). Evolution of cytokinin biosynthesis and degradation. *Journal of experimental botany*, 62(8), 2431–2452.
- Frébortová, J., & Frébort, I. (2021). Biochemical and Structural Aspects of Cytokinin Biosynthesis and Degradation in Bacteria. *Microorganisms*, 9(6), 1314.
- Frébortová, J., Fraaije, M. W., Galuszka, P., Sebela, M., Pec, P., Hrbáč, J., Novák, O., Bilyeu, K. D., English, J. T., & Frébort, I. (2004). Catalytic reaction of cytokinin dehydrogenase: preference for quinones as electron acceptors. *The Biochemical journal*, 380(Pt 1), 121–130.
- Fröhlich, V., & Feller, U. (1991). Effect of phloem interruption on senescence and protein remobilization in the flag leaf of field-grown wheat. *Biochem Physiol Pflanzen*, 187, 139–147.
- G. J. Loake, P. Ayyar, S. Howat, (2017). in *Encyclopedia of Applied Plant Sciences (Second Edition)*, B. Thomas, B. G. Murray, D. J. Murphy, Eds. (Academic Press, Oxford), 430-436.
- Galuszka P., Popelková H., Werner T., Frébortová J., Pospíšilová H., Mik V., et al. (2007) Biochemical Characterization of Cytokinin Oxidases/Dehydrogenases from Arabidopsis thaliana Expressed in Nicotiana tabacum L. *Journal Of Plant Growth Regulation*, 26, 255-267.
- Galuszka, P., Frébort, I., Šebela, M., Šauer, P., Jacobsen, S., & Peč, P. (2001). Cytokinin oxidase or dehydrogenase? Mechanism of cytokinin degradation in cereals. *European journal of biochemistry*, 268(2), 450–461.
- Galuszka, P., Frébort, I., Šebela, M., & Peč, P. (2000). Degradation of cytokinins by cytokinin oxidases in plants. *Plant Growth Regulation*, 32, 315-327.
- Gamborg, O., & Phillips, G.C. (Eds.). (1995). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture: Fundamental Methods*. Springer Science & Business Media. Berlin, Germany.
- Gamborg, O.L., & Phillips, G.C. (1995). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture. Springer Lab Manual*.
- Gan, S., & Amasino, R. M. (1995). Inhibition of leaf senescence by autoregulated production of cytokinin. *Science (New York, N.Y.)*, 270(5244), 1986–1988.
- Gan, S., & Amasino, R. M. (1997). Making Sense of Senescence (Molecular Genetic Regulation and Manipulation of Leaf Senescence). *Plant physiology*, 113(2), 313–319.
- Gao, R., & Stock, A. M. (2009). Biological insights from structures of two-component proteins. *Annual review of microbiology*, 63, 133–154.
- Gebauerová E. (2020) Vliv ročního období na obsah cytokininů v *Arabidopsis thaliana*. Diplomová práce. Olomouc, Univerzita Palackého, Přírodovědecká fakulta, Laboratoř růstových regulátorů.
- Geem, K. R., Lim, Y., Hong, J., Bae, W., Lee, J., Han, S., Gil, J., Cho, H., & Ryu, H. (2024). Cytokinin signaling promotes root secondary growth and bud formation in *Panax ginseng*. *Journal of Ginseng Research*, 48(2), 220-228.
- Gendron, J. M., Pruneda-Paz, J. L., Doherty, C. J., Gross, A. M., Kang, S. E., & Kay, S. A. (2012). Arabidopsis circadian clock protein, TOC1, is a DNA-binding transcription factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(8), 3167–3172.
- Gepstein, S., & Glick, B. R. (2013). Strategies to ameliorate abiotic stress-induced plant senescence. *Plant molecular biology*, 82(6), 623–633.
- Gerhauser D., Bopp M. (1990). Cytokinin oxidases in mosses. 2. Metabolism of kinetin and benzyladenine in vivo. *Journal of Plant Physiology* 135, 714–718.
- Gillissen, B., Bürkle, L., André, B., Kühn, C., Rentsch, D., Brandl, B., & Frommer, W. B. (2000). A new family of high-affinity transporters for adenine, cytosine, and purine derivatives in Arabidopsis. *The Plant cell*, 12(2), 291–300.

- Giovani, B., Byrdin, M., Ahmad, M., & Brettel, K. (2003). Light-induced electron transfer in a cryptochrome blue-light photoreceptor. *Nature structural biology*, *10*(6), 489–490.
- Girke, C., Daumann, M., Niopek-Witz, S., & Möhlmann, T. (2014). Nucleobase and nucleoside transport and integration into plant metabolism. *Frontiers in plant science*, *5*, 443.
- Golovko, A., Sitbon, F., Tillberg, E., & Nicander, B. (2002). Identification of a tRNA isopentenyltransferase gene from *Arabidopsis thaliana*. *Plant molecular biology*, *49*(2), 161–169.
- Grayling, A., & Hanke, D. E. (1992). Cytokinins in exudates from leaves and roots of red Perilla. *Phytochemistry*, *31*(6), 1863–1868.
- Grbić, V., Bleecker, A. B. (1995) Ethylene regulates the timing of leaf senescence in *Arabidopsis*, *Plant Journal* *8*, 595-602.
- Greenham, K., & McClung, C. R. (2015). Integrating circadian dynamics with physiological processes in plants. *Nature reviews. Genetics*, *16*(10), 598–610.
- Grefen, C., & Harter, K. (2004). Plant two-component systems: principles, functions, complexity and cross talk. *Planta*, *219*(5), 733–742.
- Guo, Y., & Gan, S. (2005). Leaf senescence: signals, execution, and regulation. *Current topics in developmental biology*, *71*, 83–112.
- Gutierrez C. (2009). The *Arabidopsis* cell division cycle. *The arabidopsis book*, *7*, e0120.
- Ha, S., Vankova, R., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K., & Tran, L. S. (2012). Cytokinins: metabolism and function in plant adaptation to environmental stresses. *Trends in plant science*, *17*(3), 172–179.
- Hanano, S., Domagalska, M. A., Nagy, F., & Davis, S. J. (2006). Multiple phytohormones influence distinct parameters of the plant circadian clock. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms*, *11*(12), 1381–1392.
- Hare, P. D., & van Staden, J. (1994). Cytokinin oxidase: Biochemical features and physiological significance. *Physiologia Plantarum*, *91*(1), 128-136.
- Harmer, S. L., Hogenesch, J. B., Straume, M., Chang, H. S., Han, B., Zhu, T., Wang, X., Kreps, J. A., & Kay, S. A. (2000). Orchestrated transcription of key pathways in *Arabidopsis* by the circadian clock. *Science (New York, N.Y.)*, *290*(5499), 2110–2113.
- Hartig, K., & Beck, E. (2005). Endogenous cytokinin oscillations control cell cycle progression of tobacco BY-2 cells. *Plant biology (Stuttgart, Germany)*, *7*(1), 33–40.
- Hausarová, E., Swaczynová, J., Dolezal, K., Lenobel, R., Popa, I., Hajdúch, M., Vydra, D., Fuksová, K., & Strnad, M. (2005). Batch immunoextraction method for efficient purification of aromatic cytokinins. *Journal of chromatography. A*, *1100*(1), 116–125.
- Hazen, S. P., Schultz, T. F., Pruneda-Paz, J. L., Borevitz, J. O., Ecker, J. R., & Kay, S. A. (2005). LUX ARRHYTHMO encodes a Myb domain protein essential for circadian rhythms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *102*(29), 10387–10392.
- Henson, I. E., & Wareing, P. F. (1974a). Cytokinins in *Xanthium strumarium*: A rapid response to short day treatment. *Physiologia Plantarum*, *32*(2), 185–187.
- Henson, I. E., & Wareing, P. F. (1977b). Cytokinins in *Xanthium strumarium* L.: Some aspects of the photoperiodic control of endogenous levels. *New Phytologist*, *78*(3), 35–45.
- Henson, I. E., & Wareing, P. F. (1977c). Cytokinins in *Xanthium strumarium* L.: Distribution in the plant and production in the root system. *Journal of Experimental Botany*, *27*, 1268–1278.
- Heyl A, Wulfetange K, Pils B, Nielsen N, Romanov GA, Schmulling T (2007) Evolutionary proteomics identifies amino acids essential for ligand-binding of the cytokinin receptor CHASE domain. *BMC Evol Biol* *7*:62–69
- Heyl, A., Riefler, M., Romanov, G. A., & Schmülling, T. (2012). Properties, functions and evolution of cytokinin receptors. *European journal of cell biology*, *91*(4), 246–256.
- Higuchi M., Pischke M. S., Mahonen A. P., Miyawaki K., Hashimoto Y., Seki M., et al. (2004) In planta functions of the *Arabidopsis* cytokinin receptor family. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences* *101*, 8821-8826.
- Hirose N., Takei K., Kuroha T., Kamada-Nobusada T., Hayashi H., Sakakibara H. (2007). Regulation of cytokinin biosynthesis, compartmentalization and translocation. *Journal Of Experimental Botany*, *59*, 75-83.
- Hirose, N., Takei, K., Kuroha, T., Kamada-Nobusada, T., Hayashi, H., & Sakakibara, H. (2008). Regulation of cytokinin biosynthesis, compartmentalization and translocation. *Journal of experimental botany*, *59*(1), 75–83.
- Hošek, P., Hoyerová, K., Kiran, N. S., Dobrev, P. I., Zahajská, L., Filepová, R., Motyka, V., Müller, K., & Kamínek, M. (2020). Distinct metabolism of N-glucosides of isopentenyladenine and trans-zeatin determines cytokinin metabolic spectrum in *Arabidopsis*. *The New phytologist*, *225*(6), 2423–2438.
- Hou, B., Lim, E. K., Higgins, G. S., & Bowles, D. J. (2004). N-glucosylation of cytokinins by glycosyltransferases of *Arabidopsis thaliana*. *The Journal of biological chemistry*, *279*(46), 47822–47832.
- Houba-Hérin, N., Pethe, C., d'Alayer, J., & Laloue, M. (1999). Cytokinin oxidase from *Zea mays*: purification, cDNA cloning and expression in moss protoplasts. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, *17*(6), 615–626.

- Hoyerová, K., Gaudinová, A., Malbeck, J., Dobrev, P. I., Kocábek, T., Solcová, B., Trávníčková, A., & Kamínek, M. (2006). Efficiency of different methods of extraction and purification of cytokinins. *Phytochemistry*, *67*(11), 1151–1159.
- Huang, W., Pérez-García, P., Pokhilko, A., Millar, A. J., Antoshechkin, I., Riechmann, J. L., & Mas, P. (2012). Mapping the core of the Arabidopsis circadian clock defines the network structure of the oscillator. *Science (New York, N.Y.)*, *336*(6077), 75–79.
- Humbeck, K., Quast, S., & Krupinska, K. (1996). Functional and molecular changes in the photosynthetic apparatus during senescence of flag leaves from field-grown barley plants. *Plant Cell Environ.*, *19*, 337–344.
- Hwang, I., Sheen, J., & Müller, B. (2012). Cytokinin signaling networks. *Annual review of plant biology*, *63*, 353–380.
- Chen, M., & Chory, J. (2011). Phytochrome signaling mechanisms and the control of plant development. *Trends in cell biology*, *21*(11), 664–671.
- Chen, M., Chory, J., & Fankhauser, C. (2004). Light signal transduction in higher plants. *Annual review of genetics*, *38*, 87–117.
- Cheng, Y., Cao, L., Wang, S., Li, Y., Shi, X., Liu, H., Li, L., Zhang, Z., Fowke, L. C., Wang, H., & Zhou, Y. (2013). Downregulation of multiple CDK inhibitor ICK/KRP genes upregulates the E2F pathway and increases cell proliferation, and organ and seed sizes in Arabidopsis. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, *75*(4), 642–655.
- Cheung, J., & Hendrickson, W. A. (2010). Sensor domains of two-component regulatory systems. *Current opinion in microbiology*, *13*(2), 116–123.
- Christie, J. M., Blackwood, L., Petersen, J., & Sullivan, S. (2015). Plant flavoprotein photoreceptors. *Plant & cell physiology*, *56*(3), 401–413.
- Ikeuchi, M., Favero, D. S., Sakamoto, Y., Iwase, A., Coleman, D., Rymen, B., & Sugimoto, K. (2019). Molecular Mechanisms of Plant Regeneration. *Annual review of plant biology*, *70*, 377–406.
- Inoue, T., Higuchi, M., Hashimoto, Y., Seki, M., Kobayashi, M., Kato, T., Tabata, S., Shinozaki, K., & Kakimoto, T. (2001). Identification of CRE1 as a cytokinin receptor from Arabidopsis. *Nature*, *409*(6823), 1060–1063.
- Ishida, K., Yamashino, T., & Mizuno, T. (2008). Expression of the cytokinin-induced type-A response regulator gene ARR9 is regulated by the circadian clock in Arabidopsis thaliana. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, *72*(11), 3025–3029.
- Ishihama, Y., Rappsilber, J., & Mann, M. (2006). Modular stop and go extraction tips with stacked disks for parallel and multidimensional Peptide fractionation in proteomics. *Journal of proteome research*, *5*(4), 988–994.
- J. Voller, B. Maková, A. Kadlecová, G. Gonzalez, and M. Strnad, “Plant hormone cytokinins for modulating human aging and age-related diseases,” in *Hormones in Ageing and Longevity*, 311–335, Springer, 2017.
- Jenkins G. I. (2014). The UV-B photoreceptor UVR8: from structure to physiology. *The Plant cell*, *26*(1), 21–37.
- John, M. C., & Amasino, R. M. (1988). Expression of an Agrobacterium Ti plasmid gene involved in cytokinin biosynthesis is regulated by virulence loci and induced by plant phenolic compounds. *Journal of bacteriology*, *170*(2), 790–795.
- Jones RJ, Schreiber BM, McNeil K, Brenner ML, Foxon G (1992). Cytokinin levels and oxidase activity during kernel development. In M Kamínek, DWS Mok, E Zažímalová, eds, *Physiology and Biochemistry of Cytokinins in Plants*. SPB Academic Publishing, The Hague, The Netherlands, 235–239.
- Jones, R. J., & Schreiber, B. M. N. (1997). Role and function of cytokinin oxidase in plants. *Plant Growth Regulation*, *23*, 123–134.
- Kabbara, S., Schmölling, T., & Papon, N. (2018). CHASEing Cytokinin Receptors in Plants, Bacteria, Fungi, and Beyond. *Trends in plant science*, *23*(3), 179–181.
- Kakimoto T. (1996). CKII, a histidine kinase homolog implicated in cytokinin signal transduction. *Science (New York, N.Y.)*, *274*(5289), 982–985.
- Kakimoto T. (2001). Identification of plant cytokinin biosynthetic enzymes as dimethylallyl diphosphate:ATP/ADP isopentenyltransferases. *Plant & cell physiology*, *42*(7), 677–685.
- Kamada-Nobusada, T., & Sakakibara, H. (2009). Molecular basis for cytokinin biosynthesis. *Phytochemistry*, *70*(4), 444–449.
- Kami, C., Lorrain, S., Hornitschek, P., & Fankhauser, C. (2010). Light-regulated plant growth and development. *Current topics in developmental biology*, *91*, 29–66.
- Kamínek M. (1992). Progress in cytokinin research. *Trends in Biotechnology*, *10*, 159–164.
- Kasemir, H., & Mohr, H. (1982). Coaction of three factors controlling chlorophyll and anthocyanin synthesis. *Planta*, *156*(3), 282–288.
- Kebrom, T. H., & Mullet, J. E. (2016). Transcriptome Profiling of Tiller Buds Provides New Insights into PhyB Regulation of Tillering and Indeterminate Growth in Sorghum. *Plant physiology*, *170*(4), 2232–2250.
- Keough, T., Lacey, M. P., & Youngquist, R. S. (2002). Solid-phase derivatization of tryptic peptides for rapid protein identification by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Rapid communications in mass spectrometry : RCM*, *16*(11), 1003–1015.

- Keshishian, E. A., Hallmark, H. T., Ramaraj, T., Plačková, L., Sundararajan, A., Schilkey, F., Novák, O., & Rashotte, A. M. (2018). Salt and oxidative stresses uniquely regulate tomato cytokinin levels and transcriptomic response. *Plant direct*, 2(7), e00071.
- Kieber J. J., Schaller G. E. (2014) Cytokinins. The Arabidopsis Book 12.
- Kieber, J. J., & Schaller, G. E. (2018). Cytokinin signaling in plant development. *Development (Cambridge, England)*, 145(4), dev149344.
- Klee, H. J., & Romano, C. P. (1994). The roles of phytohormones in development as studied in transgenic plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 13, 311-324.
- Kocmánková P. (2020) Vliv intenzity na množství cytokininů v intaktních rostlinách *Arabidopsis thaliana*. Bakalářská práce. Olomouc, Univerzita Palackého, Přírodovědecká fakulta, Laboratoř růstových regulátorů.
- Koehler, K. H. (1972). Photocontrol of betacyanin synthesis in *Amaranthus caudatus* seedlings in the presence of kinetin. *Phytochemistry*, 11, 133-137.
- Koch, K. E. (1996). Carbohydrate-modulated gene expression in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 47, 509–540.
- Kolmos, E., Nowak, M., Werner, M., Fischer, K., Schwarz, G., Mathews, S., Schoof, H., Nagy, F., Bujnicki, J. M., & Davis, S. J. (2009). Integrating ELF4 into the circadian system through combined structural and functional studies. *HFSP journal*, 3(5), 350–366.
- Kong, S. G., & Okajima, K. (2016). Diverse photoreceptors and light responses in plants. *Journal of Plant Research*, 129, 111–114.
- Kowalska, M., Galuszka, P., Frébortová, J., Šebela, M., Béres, T., Hluska, T., Šmehilová, M., Bilyeu, K. D., & Frébort, I. (2010). Vacuolar and cytosolic cytokinin dehydrogenases of *Arabidopsis thaliana*: heterologous expression, purification and properties. *Phytochemistry*, 71(17-18), 1970–1978.
- Kozlowski, T. T., & Pallardy, S. G. (1997). Physiological regulation of vegetative growth. In *Growth Control in Woody Plants*
- Krapp, A., & Stitt, M. (1994). Influence of high carbohydrate content on the activity of plastidic and cytosolic isoenzyme pairs in photosynthetic tissues. *Plant Cell Environ.*, 17, 861–866.
- Krapp, A., Quick, W. P., & Stitt, M. (1991). Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase-oxygenase, other Calvin-cycle enzymes, and chlorophyll decrease when glucose is supplied to mature spinach leaves via the transpiration stream. *Planta*, 186(1), 58–69.
- Kudo T., Kiba T., Sakakibara H. (2010). Metabolism and long-distance translocation of cytokinins. *Journal of Integrative Plant Biology*, 52, 53–60.
- Kurakawa, T., Ueda, N., Maekawa, M., Kobayashi, K., Kojima, M., Nagato, Y., Sakakibara, H., & Kyojuka, J. (2007). Direct control of shoot meristem activity by a cytokinin-activating enzyme. *Nature*, 445(7128), 652–655.
- Kuroha, T., Tokunaga, H., Kojima, M., Ueda, N., Ishida, T., Nagawa, S., Fukuda, H., Sugimoto, K., & Sakakibara, H. (2009). Functional analyses of LONELY GUY cytokinin-activating enzymes reveal the importance of the direct activation pathway in Arabidopsis. *The Plant cell*, 21(10), 3152–3169.
- Kusaba, M., Tanaka, A., & Tanaka, R. (2013). Stay-green plants: what do they tell us about the molecular mechanism of leaf senescence. *Photosynthesis research*, 117(1-3), 221–234.
- Kwade, Z., Swiatek, A., Azmi, A., Goossens, A., Inzé, D., Van Onckelen, H., & Roef, L. (2005). Identification of four adenosine kinase isoforms in tobacco BY-2 cells and their putative role in the cell cycle-regulated cytokinin metabolism. *The Journal of biological chemistry*, 280(17), 17512–17519.
- Laureys, F., Dewitte, W., Witters, E., Van Montagu, M., Inzé, D., & Van Onckelen, H. (1998). Zeatin is indispensable for the G2-M transition in tobacco BY-2 cells. *FEBS letters*, 426(1), 29–32.
- Laureys, F., Smets, R., Lenjou, M., Van Bockstaele, D., Inzé, D., & Van Onckelen, H. (1999). A low content in zeatin type cytokinins is not restrictive for the occurrence of G1/S transition in tobacco BY-2 cells. *FEBS letters*, 460(1), 123–128.
- Laurière, C. (1983). Enzymes and leaf senescence. *Physiol. Vég.*, 21, 1159.
- Lejeune P., Kinet J.-M., Bernier G. (1988) Cytokinin Fluxes during Floral Induction in the Long Day Plant *Sinapis alba* L. *Plant Physiology*, 86, 1095-1098.
- Letham D. S. (1963). Zeatin, a factor inducing cell division isolated from *Zea mays*. *Life Sciences*, 2, 569-573.
- Letham D.S., Palni L.M. S. (1983). The Biosynthesis and Metabolism of Cytokinins. *Annual Review of Plant Physiology*, 34(1), 163–197.
- Letham, D. S. (1973). Cytokinins from *Zea mays*. *Phytochemistry*, 12(10), 2445–2455.
- Letham, D. S., Summons, R. E., Parker, C. W., et al., (1979). Regulators of cell division in plant tissues. *Planta*, 146, 71–74.
- Li, C., & Bangerth, F. (1992). The possible role of cytokinins, ethylene, and indoleacetic acid in apical dominance. In C. Karssen, L. van Loon, & D. Vreugdenhil (Eds.), *Progress in Plant Growth Regulation*, 431-436). Kluwer Academic Publishers.

- Li, G., Liu, K., Baldwin, S. A., & Wang, D. (2003). Equilibrative nucleoside transporters of *Arabidopsis thaliana*. cDNA cloning, expression pattern, and analysis of transport activities. *The Journal of biological chemistry*, 278(37), 35732–35742.
- Li, J., Li, G., Wang, H., & Wang Deng, X. (2011). Phytochrome signaling mechanisms. *The arabidopsis book*, 9, e0148.
- Lichtenthaler, H. K. (1999). The 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 50, 47–65.
- Lim, P. O., Kim, H. J., & Nam, H. G. (2007). Leaf senescence. *Annual review of plant biology*, 58, 115–136.
- Lin C. (2000). Plant blue-light receptors. *Trends in plant science*, 5(8), 337–342.
- Liu, B., Yang, Z., Gomez, A., Liu, B., Lin, C., & Oka, Y. (2016). Signaling mechanisms of plant cryptochromes in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of plant research*, 129(2), 137–148.
- Ljung K, Bhalerao RP, Sandberg G. Sites and homeostatic control of auxin biosynthesis in *Arabidopsis* during vegetative growth. *The Plant Journal*. 2001;28:465–474.
- Lomin, S. N., Krivosheev, D. M., Steklov, M. Y., Osolodkin, D. I., & Romanov, G. A. (2012). Receptor properties and features of cytokinin signaling. *Acta naturae*, 4(3), 31–45.
- Lymperopoulos, P., Msanne, J., & Rabara, R. (2018). Phytochrome and Phytohormones: Working in Tandem for Plant Growth and Development. *Frontiers in plant science*, 9, 1037.
- Ma, L., Gao, Y., Qu, L., Chen, Z., Li, J., Zhao, H., & Deng, X. W. (2002). Genomic evidence for COP1 as a repressor of light-regulated gene expression and development in *Arabidopsis*. *The Plant cell*, 14(10), 2383–2398.
- Maldiney, R., Leroux, B., Sabbagh, I., Sotta, B., Sossountzov, L., Miginiac, E. A., & Immunol, J. Methods. (1986). *J. Immunol. Methods*, 90, 151.
- Martin, R. C., Mok, M. C., Habben, J. E., & Mok, D. W. (2001). A maize cytokinin gene encoding an O-glucosyltransferase specific to cis-zeatin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(10), 5922–5926.
- Martin, R. C., Mok, M. C., Shaw, G., & Mok, D. W. (1989). An enzyme mediating the conversion of zeatin to dihydrozeatin in phaseolus embryos. *Plant physiology*, 90(4), 1630–1635.
- Matsumoto-Kitano, M., Kusumoto, T., Tarkowski, P., Kinoshita-Tsujimura, K., Václavíková, K., Miyawaki, K., & Kakimoto, T. (2008). Cytokinins are central regulators of cambial activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(50), 20027–20031.
- McClung C. R. (2013). Beyond *Arabidopsis*: the circadian clock in non-model plant species. *Seminars in cell & developmental biology*, 24(5), 430–436.
- McClung C. R. (2019). The Plant Circadian Oscillator. *Biology*, 8(1), 14.
- McCree, K. J. (1971). The action spectrum, absorptance and quantum yield of photosynthesis in crop plants. *Agricultural Meteorology*, 9, 191–216.
- Mi, X., Wang, X., Wu, H., Gan, L., Ding, J., & Li, Y. (2017). Characterization and expression analysis of cytokinin biosynthesis genes in *Fragaria vesca*. *Plant Growth Regulation*, 82, 139–149.
- Millar A. J. (2016). The Intracellular Dynamics of Circadian Clocks Reach for the Light of Ecology and Evolution. *Annual review of plant biology*, 67, 595–618.
- Miller C.O., Skoog F., von Saltza M.H., Strong M. (1955). Kinetin, a cell division factor from deoxyribonucleic acid. *Journal of the American Chemical Society*, 77, 1329–34.
- Miller, C.O., Skoog, F.K., Okumura, F.S., Saltza, M.H., & Strong, F.M. (1956). Isolation, Structure and Synthesis of Kinetin, a Substance Promoting Cell Division^{1,2}. *Journal of the American Chemical Society*, 78, 1375–1380.
- Miyawaki K., Tarkowski P., Matsumoto-Kitano M., Kato T., Sato S., Tarkowska D., Tabata S., Sandberg G., Kakimoto T. (2006). Roles of *Arabidopsis* ATP/ADP isopentenyltransferases and tRNA isopentenyltransferases in cytokinin biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103, 16598–16603.
- Miyawaki, K., Matsumoto-Kitano, M., & Kakimoto, T. (2004). Expression of cytokinin biosynthetic isopentenyltransferase genes in *Arabidopsis*: tissue specificity and regulation by auxin, cytokinin, and nitrate. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 37(1), 128–138.
- Mizoguchi, T., Wheatley, K., Hanzawa, Y., Wright, L., Mizoguchi, M., Song, H. R., Carré, I. A., & Coupland, G. (2002). LHY and CCA1 are partially redundant genes required to maintain circadian rhythms in *Arabidopsis*. *Developmental cell*, 2(5), 629–641.
- Mizuno T. (2004). Plant response regulators implicated in signal transduction and circadian rhythm. *Current opinion in plant biology*, 7(5), 499–505.
- Mizuno T. (2005). Two-component phosphorelay signal transduction systems in plants: from hormone responses to circadian rhythms. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 69(12), 2263–2276.
- Mizuno, K., & Komamine, A. (1978). Isolation and identification of substances inducing formation of tracheary elements in cultured carrot-root slices. *Planta*, 138(1), 59–62.

- Möhlmann, T., Mezher, Z., Schwerdtfeger, G., & Neuhaus, H. E. (2001). Characterisation of a concentrative type of adenosine transporter from *Arabidopsis thaliana* (ENT1,At). *FEBS letters*, 509(3), 370–374.
- Mochida, K., Yoshida, T., Sakurai, T., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K., & Tran, L. S. (2010). Genome-wide analysis of two-component systems and prediction of stress-responsive two-component system members in soybean. *DNA research : an international journal for rapid publication of reports on genes and genomes*, 17(5), 303–324.
- Mok, D. W. S., & Mok, M. C. (2001). Cytokinin metabolism and Action. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 52(39), 89–118.
- Mok, M. C., Martin, R. C., & David W. S. Mok. (2000). Cytokinins: Biosynthesis, Metabolism and Perception. *In Vitro Cellular & Developmental Biology. Plant*, 36(2), 102–107.
- Morris, R. O., Bilyeu, K. D., Laskey, J. G., & Cheikh, N. N. (1999). Isolation of a gene encoding a glycosylated cytokinin oxidase from maize. *Biochemical and biophysical research communications*, 255(2), 328–333.
- Mougel, C., & Zhulin, I. B. (2001). CHASE: an extracellular sensing domain common to transmembrane receptors from prokaryotes, lower eukaryotes and plants. *Trends in biochemical sciences*, 26(10), 582–584.
- Mukherjee, A., Gaurav, A. K., Singh, S., Yadav, S., Bhowmick, S., Abeyasinghe, S., & Verma, J. P. (2022). The bioactive potential of phytohormones: A review. *Biotechnology reports (Amsterdam, Netherlands)*, 35, e00748.
- Müller, D., & Leyser, O. (2011). Auxin, cytokinin and the control of shoot branching. *Annals of botany*, 107(7), 1203–1212.
- Nakamichi N. (2020). The Transcriptional Network in the Arabidopsis Circadian Clock System. *Genes*, 11(11), 1284.
- Nakamichi, N., Kiba, T., Henriques, R., Mizuno, T., Chua, N. H., & Sakakibara, H. (2010). PSEUDO-RESPONSE REGULATORS 9, 7, and 5 are transcriptional repressors in the Arabidopsis circadian clock. *The Plant cell*, 22(3), 594–605.
- Nishimura, C., Ohashi, Y., Sato, S., Kato, T., Tabata, S., & Ueguchi, C. (2004). Histidine kinase homologs that act as cytokinin receptors possess overlapping functions in the regulation of shoot and root growth in Arabidopsis. *The Plant cell*, 16(6), 1365–1377.
- Nogué, F., Gonneau, M., & Faure, J.-D. (2003). Cytokinins. In *Encyclopedia of Hormones*, Academia Press, 371–378.
- Nomura T, Tanaka Y (1977). Cytokinin activity of discadenine: a spore germination inhibitor of *Dictyostelium discoideum*. *Phytochemistry* 16, 1819–1820.
- Novák O., Tarkowski P., Tarkowská D., Doležal K., Lenobel R., Strnad M. (2003): Quantitative analysis of cytokinins in plants by liquid chromatography-singlequadrupole mass spektrometry. *Analytica Chimica Acta*, 480, 207-218.
- Novák, O., Hauserová, E., Amakorová, P., Doležal, K., & Strnad, M. (2008). Cytokinin profiling in plant tissues using ultra-performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Phytochemistry*, 69(11), 2214–2224.
- Nováková, M., Motyka, V., Dobrev, P. I., Malbeck, J., Gaudinová, A., & Vanková, R. (2005). Diurnal variation of cytokinin, auxin and abscisic acid levels in tobacco leaves. *Journal of experimental botany*, 56(421), 2877–2883.
- Osugi, A., Kojima, M., Takebayashi, Y., Ueda, N., Kiba, T., & Sakakibara, H. (2017). Systemic transport of trans-zeatin and its precursor have differing roles in Arabidopsis shoots. *Nature plants*, 3, 17112.
- Pačes V., Werstiuk E., Hall R. H. (1971). Conversion of N6-(Δ^2 -Isopentenyl)adenosine to Adenosine by Enzyme Activity in Tobacco Tissue. *Plant Physiology*, 48, 775-778.
- Paul, M. J., & Driscoll, S. P. (1997). Sugar repression of photosynthesis: the role of carbohydrates in signalling nitrogen deficiency through source:sink imbalance. *Plant Cell Environ.*, 20, 110–116.
- Pěňčík, A., Casanova-Sáez, R., Pilařová, V., Žukauskaitė, A., Pinto, R., Micol, J. L., Ljung, K., & Novák, O. (2018). Ultra-rapid auxin metabolite profiling for high-throughput mutant screening in Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany*, 69(10), 2569–2579.
- Persson, B. C., & Björk, G. R. (1993). Isolation of the gene (miaE) encoding the hydroxylase involved in the synthesis of 2-methylthio-cis-ribozeatin in tRNA of *Salmonella typhimurium* and characterization of mutants. *Journal of bacteriology*, 175(24), 7776–7785.
- Pfeiffer, H., & Kleudgen, H. K. (1980). Investigations on the phytochrome control of senescence in the photosynthetic apparatus of *Hordeum Vulgare* L. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*, 100, 437–445.
- Phalke, P., & Kavade, S. (2013). Review on hyphenated techniques. *International Journal of Chemical Studies*, 1, 157–165.
- Pils, B., & Heyl, A. (2009). Unraveling the evolution of cytokinin signaling. *Plant physiology*, 151(2), 782–791.
- Plačková L., Hrdlička J., Smýkalová I., Cvečková M., Novák O., Griga M., Doležal K. (2015) Cytokinin profiling of long-term in vitro pea (*Pisum sativum* L.) shoot cultures. *Plant Growth Regulation*, 77, 125-132.

- Plačková L., Okleštková J., Pospíšková K., Poláková K., Buček J., Stýskala J., Zatloukal M., Šafařík I., Zbořil R., Strnad M., Doležal K., Novák O. (2017): Microscale magnetic microparticle-based immunopurification of cytokinins from *Arabidopsis* root apex. *Plant Journal*, 89, 1065–1075, 2017.
- Pluskal, M. G., Bogdanova, A., Lopez, M., Gutierrez, S., & Pitt, A. M. (2002). Multiwell in-gel protein digestion and microscale sample preparation for protein identification by mass spectrometry. *Proteomics*, 2(2), 145–150.
- Powell, G. K., Hommes, N. G., Kuo, J., Castle, L. A., & Morris, R. O. (1988). Inducible expression of cytokinin biosynthesis in *Agrobacterium tumefaciens* by plant phenolics. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI*, 1(6), 235–242.
- Prerostova, S., Dobrev, P. I., Gaudinova, A., Knirsch, V., Körber, N., Pieruschka, R., Fiorani, F., Brzobohatý, B., Černý, M., Spichal, L., Humplik, J., Vanek, T., Schurr, U., & Vankova, R. (2018). Cytokinins: Their Impact on Molecular and Growth Responses to Drought Stress and Recovery in *Arabidopsis*. *Frontiers in plant science*, 9, 655.
- Procházková S., Macháčková I., Krekule J., Šebánek J. et al. (1998). Fyziologie rostlin. 1. vydání, Praha: *Academia*, 253–259.
- Quail, P. H., Boylan, M. T., Parks, B. M., Short, T. W., Xu, Y., & Wagner, D. (1995). Phytochromes: photosensory perception and signal transduction. *Science (New York, N.Y.)*, 268(5211), 675–680.
- Rappsilber, J., Ishihama, Y., & Mann, M. (2003). Stop and go extraction tips for matrix-assisted laser desorption/ionization, nanoelectrospray, and LC/MS sample pretreatment in proteomics. *Analytical chemistry*, 75(3), 663–670.
- Redig, P., Shaul, O., Inze, D., Van Montagu, M., & Van Onckelen, H. (1996). Levels of endogenous cytokinins, indole-3-acetic acid and abscisic acid during the cell cycle of synchronized tobacco BY-2 cells. *FEBS letters*, 391(1-2), 175–180.
- Reppert, S. M., & Weaver, D. R. (2002). Coordination of circadian timing in mammals. *Nature*, 418(6901), 935–941.
- Reski, R., Wehe, M., Hader, B., Marienfeld, J. R., & Abel, W. O. (1991). Cytokinin and light quality interact at the molecular level in the chloroplast mutant PC22 of the moss *Physcomitrella*. *Journal of Plant Physiology*, 138, 236–243.
- Riefler, M., Novak, O., Strnad, M., & Schmülling, T. (2006). *Arabidopsis* cytokinin receptor mutants reveal functions in shoot growth, leaf senescence, seed size, germination, root development, and cytokinin metabolism. *The Plant cell*, 18(1), 40–54.
- Richmond, A. E., & Lang, A. (1957). Effect of kinetin on protein content and survival of detached *Xanthium* leaves. *Science*, 125, 650–651.
- Rizzini, L., Favory, J. J., Cloix, C., Faggionato, D., O'Hara, A., Kaiserli, E., Baumeister, R., Schäfer, E., Nagy, F., Jenkins, G. I., & Ulm, R. (2011). Perception of UV-B by the *Arabidopsis* UVR8 protein. *Science (New York, N.Y.)*, 332(6025), 103–106.
- Rockwell, N. C., Su, Y. S., & Lagarias, J. C. (2006). Phytochrome structure and signaling mechanisms. *Annual review of plant biology*, 57, 837–858.
- Roef, L., & Van Onckelen, H. (2010). Cytokinin Regulation of the Cell Division Cycle. In P.J. Davies (Ed.), *Plant Hormones*, 323–345. Springer.
- Rohmer M. (1999). The discovery of a mevalonate-independent pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria, algae and higher plants. *Natural product reports*, 16(5), 565–574.
- Romanov G. A. (2009) How do cytokinins affect the cell?. *Russian Journal Of Plant Physiology* 56, 268-290.
- Romanov G. A., Lomin S. N., Schmülling T. (2006). Biochemical characteristics and ligand-binding properties of *Arabidopsis* cytokinin receptor AHK3 compared to CRE1/AHK4 as revealed by a direct binding assay. *Journal Of Experimental Botany*, 57, 4051–4058.
- Rousscaux, M. C., Hall, A. J., & Sánchez, R. A. (1996). Far-red enrichment and photosynthetically active radiation level influence leaf senescence in field-grown sunflower. *Physiol Plant*, 96, 217–224.
- Sage, L. C. (2012). *Pigment of the imagination: a history of phytochrome research*. Elsevier.
- Saijo, Y., Sullivan, J. A., Wang, H., Yang, J., Shen, Y., Rubio, V., Ma, L., Hoecker, U., & Deng, X. W. (2003). The COP1-SPA1 interaction defines a critical step in phytochrome A-mediated regulation of HY5 activity. *Genes & development*, 17(21), 2642–2647.
- Saito, H., Oda, Y., Sato, T., Kuromitsu, J., & Ishihama, Y. (2006). Multiplexed two-dimensional liquid chromatography for MALDI and nanoelectrospray ionization mass spectrometry in proteomics. *Journal of proteome research*, 5(7), 1803–1807.
- Sakakibara H. (2006). Cytokinins: activity, biosynthesis, and translocation. *Annual review of plant biology*, 57, 431–449.
- Sakakibara, H., Kasahara, H., Ueda, N., Kojima, M., Takei, K., Hishiyama, S., Asami, T., Okada, K., Kamiya, Y., Yamaya, T., & Yamaguchi, S. (2005). *Agrobacterium tumefaciens* increases cytokinin production in plastids

- by modifying the biosynthetic pathway in the host plant. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(28), 9972–9977.
- Sakamoto, T., Sakakibara, H., Kojima, M., Yamamoto, Y., Nagasaki, H., Inukai, Y., Sato, Y., & Matsuoka, M. (2006). Ectopic expression of KNOTTED1-like homeobox protein induces expression of cytokinin biosynthesis genes in rice. *Plant physiology*, 142(1), 54–62.
- Sakano, Y., Okada, Y., Matsunaga, A., Suwama, T., Kaneko, T., Ito, K., Noguchi, H., & Abe, I. (2004). Molecular cloning, expression, and characterization of adenylate isopentenyltransferase from hop (*Humulus lupulus* L.). *Phytochemistry*, 65(17), 2439–2446.
- Sakuraba Y. (2021). Light-Mediated Regulation of Leaf Senescence. *International journal of molecular sciences*, 22(7), 3291.
- Salomé, P. A., To, J. P., Kieber, J. J., & McClung, C. R. (2006). Arabidopsis response regulators ARR3 and ARR4 play cytokinin-independent roles in the control of circadian period. *The Plant cell*, 18(1), 55–69.
- Samatha, Y., Srividya, A., Ajitha, A., & Rao, V. U. M. (2015). Ultra performance liquid chromatography (UPLC). *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 8, 356–367.
- Sanchez, S. E., & Kay, S. A. (2016). The Plant Circadian Clock: From a Simple Timekeeper to a Complex Developmental Manager. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 8(12), a027748.
- Sezgin, Mehmet & Kahya, Mustafa. (2018). Phytohormones. *Bitlis Eren University Journal of Science and Technology*, 8, 35-39.
- Schaffer, R., Ramsay, N., Samach, A., Corden, S., Putterill, J., Carré, I. A., & Coupland, G. (1998). The late elongated hypocotyl mutation of Arabidopsis disrupts circadian rhythms and the photoperiodic control of flowering. *Cell*, 93(7), 1219–1229.
- Schaller, G. E., Kieber, J. J., & Shiu, S. H. (2008). Two-component signaling elements and histidyl-aspartyl phosphorelays. *The arabidopsis book*, 6, e0112.
- Schmülling, T., Werner, T., Riefler, M., Krupková, E., & Bartrina y Manns, I. (2003). Structure and function of cytokinin oxidase/dehydrogenase genes of maize, rice, Arabidopsis and other species. *Journal of plant research*, 116(3), 241–252.
- Schwacke, R., Schneider, A., van der Graaff, E., Fischer, K., Catoni, E., Desimone, M., Frommer, W. B., Flügge, U. I., & Kunze, R. (2003). ARAMEMNON, a novel database for Arabidopsis integral membrane proteins. *Plant physiology*, 131(1), 16–26.
- Singh, M., & Mas, P. (2018). A Functional Connection between the Circadian Clock and Hormonal Timing in Arabidopsis. *Genes*, 9(12), 567.
- Singh, S., Prasad, L., Kumar, V., Roy, S., & Patnaik, S. K. (2016). Ultra performance liquid chromatography: High throughput analysis over high performance liquid chromatography. *International Journal of Engineering and Allied Sciences*, 2, 19–25.
- Skoog, F., Armstrong, D. J., Cherayil, J. D., Hampel, A. E., & Bock, R. M. (1966). Cytokinin activity: localization in transfer RNA preparations. *Science*, 154, 1354–1356.
- Smart, C. M., Scofield, S. R., Bevan, M. W., & Dyer, T. A. (1991). Delayed Leaf Senescence in Tobacco Plants Transformed with tmr, a Gene for Cytokinin Production in Agrobacterium. *The Plant cell*, 3(7), 647–656.
- Spence, C. A., Lakshmanan, V., Donofrio, N., & Bais, H. P. (2015). Crucial Roles of Abscisic Acid Biogenesis in Virulence of Rice Blast Fungus *Magnaporthe oryzae*. *Frontiers in plant science*, 6, 1082. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.01082>
- Spíchal, L. (2012). Cytokinins - Recent news and views of evolutionally old molecules. *Functional Plant Biology*, 39(4), 267–284.
- Stitt, M., von Schaewen, A., & Willmitzer, L. (1991). "Sink" regulation of photosynthetic metabolism in transgenic tobacco plants expressing yeast invertase in their cell wall involves a decrease of the Calvin-cycle enzymes and an increase of glycolytic enzymes. *Planta*, 183(1), 40–50.
- Stock, A. M., Robinson, V. L., & Goudreau, P. N. (2000). Two-component signal transduction. *Annual review of biochemistry*, 69, 183–215.
- Strayer, C., Oyama, T., Schultz, T. F., Raman, R., Somers, D. E., Más, P., Panda, S., Kreps, J. A., & Kay, S. A. (2000). Cloning of the Arabidopsis clock gene TOC1, an autoregulatory response regulator homolog. *Science (New York, N.Y.)*, 289(5480), 768–771.
- Strnad M. (1997). The aromatic cytokinins. *Plant Physiol* 101, 674-688.
- Strnad M., Hanuš J., Vaněk T., Kamínek M., Ballantine J. A., Fussell B., Hanke D. E. (1997). MetaTopolin, a Highly Active Aromatic Cytokinin from Poplar Leaves (*Populus x canadensis* Moench., cv. Robusta). *Phytochemistry* 45, 213-218
- Strnad, J., Eppler, C. M., Corbett, M., & Hadcock, J. R. (1993). The rat SSTR2 somatostatin receptor subtype is coupled to inhibition of cyclic AMP accumulation. *Biochemical and biophysical research communications*, 191(3), 968–976.

- Strnad, M., Peters, W., Beck, E., & Kaminek, M. (1992). Immunodetection and identification of N⁶-(o-Hydroxybenzylamino) purine as a naturally occurring cytokinin in populus × canadensis moench cv robusta leaves. *Plant Physiology*.
- Su, Y. H., Liu, Y. B., & Zhang, X. S. (2011). Auxin-cytokinin interaction regulates meristem development. *Molecular plant*, 4(4), 616–625.
- Sun J., Hirose N., Wang X., Wen P., Xue L., Sakakibara H., Zuo J. (2005) Arabidopsis SOI33/AtENT8 Gene Encodes a Putative Equilibrative Nucleoside Transporter That Is Involved in Cytokinin Transport In Planta. *Journal Of Integrative Plant Biology*, 47, 588-603.
- Sun, J., Niu, Q. W., Tarkowski, P., Zheng, B., Tarkowska, D., Sandberg, G., Chua, N. H., & Zuo, J. (2003). The Arabidopsis AtIPT8/PGA22 gene encodes an isopentenyl transferase that is involved in de novo cytokinin biosynthesis. *Plant physiology*, 131(1), 167–176.
- Susan C. Dixon, Martin, R. C., Mok, M. C., Shaw, G., & David W. S. Mok. (1989). Zeatin Glycosylation Enzymes in Phaseolus. Isolation of O-Glucosyltransferase from P. lunatus and Comparison to O-Xylosyltransferase from P. vulgaris. *Plant Physiology*, 90(4), 1316–1321.
- Suzuki, T., Miwa, K., Ishikawa, K., Yamada, H., Aiba, H., & Mizuno, T. (2001b). The Arabidopsis sensor Histidine Kinase, AHK4, can respond to cytokinins. *Plant & cell physiology*, 42(2), 107–113.
- Svačinová, J., Novák, O., Plačková, L., Lenobel, R., Holík, J., Strnad, M., & Doležal, K. (2012). A new approach for cytokinin isolation from Arabidopsis tissues using miniaturized purification: pipette tip solid-phase extraction. *Plant methods*, 8(1), 17.
- Šmehilová M., Dobrušková J., Novák O., Takáč T., Galuszka P. (2016) Cytokinin-Specific Glycosyltransferases Possess Different Roles in Cytokinin Homeostasis Maintenance. *Frontiers in Plant Science* 7.
- Takei, K., Sakakibara, H., & Sugiyama, T. (2001). Identification of genes encoding adenylate isopentenyltransferase, a cytokinin biosynthesis enzyme, in Arabidopsis thaliana. *The Journal of biological chemistry*, 276(28), 26405–26410.
- Takei, K., Ueda, N., Aoki, K., Kuromori, T., Hirayama, T., Shinozaki, K., Yamaya, T., & Sakakibara, H. (2004a). AtIPT3 is a key determinant of nitrate-dependent cytokinin biosynthesis in Arabidopsis. *Plant & cell physiology*, 45(8), 1053–1062.
- Takei, K., Yamaya, T., & Sakakibara, H. (2003). A method for separation and determination of cytokinin nucleotides from plant tissues. *Journal of plant research*, 116(3), 265–269.
- Takei, K., Yamaya, T., & Sakakibara, H. (2004b). Arabidopsis CYP735A1 and CYP735A2 encode cytokinin hydroxylases that catalyze the biosynthesis of trans-Zeatin. *The Journal of biological chemistry*, 279(40), 41866–41872.
- Tarkowski P., Doležal K., Strnad M. (2004). Analytické metody studia cytokininů. *Chemické Listy*, 98, 834–841.
- Taya, Y., Tanaka, Y., & Nishimura, S. (1978). 5'-AMP is a direct precursor of cytokinin in Dictyostelium discoideum. *Nature*, 271(5645), 545–547.
- Thimann, K. V., & Skoog, F. (1933). Studies on the Growth Hormone of Plants: III. The Inhibiting Action of the Growth Substance on Bud Development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 19(7), 714–716.
- Thomas H. (1978). Enzymes of nitrogen mobilization in detached leaves of Lolium temulentum during senescence. *Planta*, 142(2), 161–169.
- Tilbrook, K., Arongaus, A. B., Binkert, M., Heijde, M., Yin, R., & Ulm, R. (2013). The UVR8 UV-B Photoreceptor: Perception, Signaling and Response. *The arabidopsis book*, 11, e0164.
- Tokunaga, H., Kojima, M., Kuroha, T., Ishida, T., Sugimoto, K., Kiba, T., & Sakakibara, H. (2012). Arabidopsis lonely guy (LOG) multiple mutants reveal a central role of the LOG-dependent pathway in cytokinin activation. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 69(2), 355–365.
- Tucker, D. J. (1981). Phytochrome regulation of leaf senescence in cucumber and tomato. *Plant Science Letters*, 23, 103–108.
- Turner, J. E., Mok, D. W., Mok, M. C., & Shaw, G. (1987). Isolation and partial purification of an enzyme catalyzing the formation of O-xylosylzeatin in Phaseolus vulgaris embryos. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84(11), 3714–3717.
- Ullah, A., Manghwar, H., Shaban, M., Khan, A. H., Akbar, A., Ali, U., Ali, E., & Fahad, S. (2018). Phytohormones enhanced drought tolerance in plants: a coping strategy. *Environmental science and pollution research international*, 25(33), 33103–33118.
- Urao, T., Yamaguchi-Shinozaki, K., & Shinozaki, K. (2000). Two-component systems in plant signal transduction. *Trends in plant science*, 5(2), 67–74.
- van Hout, M. W., van Egmond, W. M., Franke, J. P., de Zeeuw, R. A., & de Jong, G. J. (2002). Feasibility of the direct coupling of solid-phase extraction-pipette tips with a programmed-temperature vaporiser for gas chromatographic analysis of drugs in plasma. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*, 766(1), 37–45.

- Van Kast, C. A., & Laten, H. M. (1987). Cytokinin Utilization by Adenine-Requiring Mutants of the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Plant physiology*, 83(4), 726–727.
- Vandenbussche, F., Habricot, Y., Condiff, A. S., Maldiney, R., Van der Straeten, D., & Ahmad, M. (2007). HY5 is a point of convergence between cryptochrome and cytokinin signalling pathways in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 49(3), 428–441.
- Veach, Y. K., Martin, R. C., Mok, D. W., Malbeck, J., Vankova, R., & Mok, M. C. (2003). O-glucosylation of cis-zeatin in maize. Characterization of genes, enzymes, and endogenous cytokinins. *Plant physiology*, 131(3), 1374–1380. <https://doi.org/10.1104/pp.017210>
- Vildanova M.S., Savitskaya M.A., Onishchenko G.E., Smirnova E.A. The effect of plant hormones on the components of the secretory pathway in human normal and tumor cells. *Cell Tissue Biol.* 2014;8(5):407–415.
- Voller J., Maková B., Kadlecová A., Gonzalez G., Strnad M, (2017). *Hormones in Ageing and Longevity*. Springer; Cham. Plant hormone cytokinins for modulating human aging and age-related diseases, 311–335.
- Walter, T. H., & Andrews, R. W. (2014). Recent innovations in UHPLC columns and instrumentation. *Trends in Analytical Chemistry*, 63, 14–20.
- Wang, H., Ma, L. G., Li, J. M., Zhao, H. Y., & Deng, X. W. (2001). Direct interaction of *Arabidopsis* cryptochromes with COP1 in light control development. *Science (New York, N.Y.)*, 294(5540), 154–158.
- Wang, J., Ma, X. M., Kojima, M., Sakakibara, H., & Hou, B. K. (2011). N-glucosyltransferase UGT76C2 is involved in cytokinin homeostasis and cytokinin response in *Arabidopsis thaliana*. *Plant & cell physiology*, 52(12), 2200–2213.
- Wang, Z. Y., & Tobin, E. M. (1998). Constitutive expression of the CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1 (CCA1) gene disrupts circadian rhythms and suppresses its own expression. *Cell*, 93(7), 1207–1217.
- Wei, N., & Deng, X. W. (2003). The COP9 signalosome. *Annual review of cell and developmental biology*, 19, 261–286.
- Werner, T., & Schmülling, T. (2009). Cytokinin action in plant development. *Current opinion in plant biology*, 12(5), 527–538.
- Werner, T., Köllmer, I., Bartrina, I., Holst, K., & Schmülling, T. (2006). New insights into the biology of cytokinin degradation. *Plant biology (Stuttgart, Germany)*, 8(3), 371–381.
- Werner, T., Motyka, V., Laucou, V., Smets, R., Van Onckelen, H., & Schmülling, T. (2003). Cytokinin-deficient transgenic *Arabidopsis* plants show multiple developmental alterations indicating opposite functions of cytokinins in the regulation of shoot and root meristem activity. *The Plant cell*, 15(11), 2532–2550.
- Whitty, C. D., & Hall, R. H. (1974). A cytokinin oxidase in *Zea mays*. *Canadian journal of biochemistry*, 52(9), 789–799.
- Williams, M.E., (2011). Introduction to Phytohormones. Teaching Tools in Plant Biology: Lecture Notes. The Plant Cell (online).
- Woo, H. R., Kim, H. J., Lim, P. O., & Nam, H. G. (2019). Leaf Senescence: Systems and Dynamics Aspects. *Annual review of plant biology*, 70, 347–376.
- Wormit, A., Traub, M., Flörchinger, M., Neuhaus, H. E., & Möhlmann, T. (2004). Characterization of three novel members of the *Arabidopsis thaliana* equilibrative nucleoside transporter (ENT) family. *The Biochemical journal*, 383(Pt 1), 19–26.
- Xiao-Ping S., Xi-Gui S. (2006). Cytokinin- and auxin-induced stomatal opening is related to the change of nitric oxide levels in guard cells in broad bean. *Physiol. Plant*, 128, 569–579.
- Yamada H., Suzuki T., Terada K., Takei K., Ishikawa K., Miwa K., Yamashino T., Mizuno T. (2001): The *Arabidopsis* AHK4 histidine kinase is a cytokinin-binding receptor that transduces cytokinin signals across the membrane. *Plant and Cell Physiology*, 42, 1017-1023.
- Yanagawa, Y., Sullivan, J. A., Komatsu, S., Gusmaroli, G., Suzuki, G., Yin, J., Ishibashi, T., Saijo, Y., Rubio, V., Kimura, S., Wang, J., & Deng, X. W. (2004). *Arabidopsis* COP10 forms a complex with DDB1 and DET1 in vivo and enhances the activity of ubiquitin conjugating enzymes. *Genes & development*, 18(17), 2172–2181.
- Yang, H. Q., Tang, R. H., & Cashmore, A. R. (2001). The signaling mechanism of *Arabidopsis* CRY1 involves direct interaction with COP1. *The Plant cell*, 13(12), 2573–2587.
- Yang, H. Q., Wu, Y. J., Tang, R. H., Liu, D., Liu, Y., & Cashmore, A. R. (2000). The C termini of *Arabidopsis* cryptochromes mediate a constitutive light response. *Cell*, 103(5), 815–827.
- Yang, W., Cortijo, S., Korsbo, N., Roszak, P., Schiessl, K., Gurzadyan, A., Wightman, R., Jönsson, H., & Meyerowitz, E. (2021). Molecular mechanism of cytokinin-activated cell division in *Arabidopsis*. *Science (New York, N.Y.)*, 371(6536), 1350–1355.
- Yoshida S. (2003). Molecular regulation of leaf senescence. *Current opinion in plant biology*, 6(1), 79–84.
- Záveská Drábková, L., Honys, D., & Motyka, V. (2021). Evolutionary diversification of cytokinin-specific glucosyltransferases in angiosperms and enigma of missing cis-zeatin O-glucosyltransferase gene in Brassicaceae. *Scientific Reports*, 11, 7885.

- Zeugner, A., Byrdin, M., Bouly, J. P., Bakrim, N., Giovani, B., Brettel, K., & Ahmad, M. (2005). Light-induced electron transfer in Arabidopsis cryptochrome-1 correlates with in vivo function. *The Journal of biological chemistry*, 280(20), 19437–19440.
- Zhang, H. J., Dong, H. Z., Li, W. J., & Zhang, D. M. (2012). Effects of soil salinity and plant density on yield and leaf senescence of field-grown cotton. *J. Agric. Crop Sci.*, 198, 27–37.
- Zhang, K., Novak, O., Wei, Z., Gou, M., Zhang, X., Yu, Y., Yang, H., Cai, Y., Strnad, M., & Liu, C. J. (2014). Arabidopsis ABCG14 protein controls the acropetal translocation of root-synthesized cytokinins. *Nature communications*, 5, 3274.
- Zheng, B., Deng, Y., Mu, J., Ji, Z., Xiang, T., Niu, Q. W., Chua, N. H., & Zuo, J. (2006). Cytokinin affects circadian-clock oscillation in a phytochrome B- and Arabidopsis response regulator 4-dependent manner. *Physiologia Plantarum*, 127, 277–292.
- Zubko, E., Adams, C. J., Macháèková, I., Malbeck, J., Scollan, C., & Meyer, P. (2002). Activation tagging identifies a gene from *Petunia hybrida* responsible for the production of active cytokinins in plants. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 29(6), 797–808.
- Zubo, Y. O., Yamburenko, M. V., Selivankina, S. Y., Shakirova, F. M., Avalbaev, A. M., Kudryakova, N. V., Zubkova, N. K., Liere, K., Kulaeva, O. N., Kusnetsov, V. V., & Börner, T. (2008). Cytokinin stimulates chloroplast transcription in detached barley leaves. *Plant physiology*, 148(2), 1082–1093.

PŘÍLOHY

Tab. 1: Endogenní koncentrační hladiny cytokininů v 10denních semenáčcích *Arabidopsis thaliana* pěstovaných při světelných podmínkách 8h/16h, 12h/12h, 16h/8h za **jarní období**. Výsledky jsou uvedeny ve tvaru: průměrná hodnota ± směrodatná odchylka, n= 3.

Světelné podmínky	8h/16h	12h/12h	16h/8h
typ cytokininu	Koncentrace [pmol/g FW]		
tZ	0,12 ± 0,03	0,15 ± 0,01	0,18 ± 0,01
tZOG	5,27 ± 0,50	4,48 ± 0,18	5,80 ± 0,42
tZR	1,19 ± 0,11	2,19 ± 0,17	2,46 ± 0,37
tZROG	<LOD	<LOD	0,53 ± 0,04
tZ7G	15,98 ± 1,17	13,46 ± 0,56	17,03 ± 0,62
tZ9G	5,51 ± 0,75	4,79 ± 0,19	6,77 ± 0,28
tZR5'MP	3,39 ± 0,00	4,01 ± 0,97	4,56 ± 0,19
Celkové CK tZ-typu	31,45 ± 2,57	29,07 ± 2,09	37,34 ± 1,94
cZ	0,11 ± 0,01	0,20 ± 0,05	0,17 ± 0,01
cZOG	0,89 ± 0,22	1,28 ± 0,25	1,01 ± 0,03
cZR	2,40 ± 0,68	7,54 ± 3,00	3,35 ± 0,82
cZROG	1,00 ± 0,49	1,16 ± 0,06	0,96 ± 0,03
cZ7G	12,96 ± 1,93	9,69 ± 0,43	9,77 ± 0,60
cZ9G	0,63 ± 0,03	0,42 ± 0,03	0,38 ± 0,06
cZR5'MP	<LOD	10,96 ± 1,13	7,14 ± 0,96
Celkové CK cZ-typu	18,00 ± 3,36	31,24 ± 4,95	22,77 ± 2,52
DHZ	<LOD	<LOD	<LOD
DHZOG	0,17 ± 0,01	0,20 ± 0,02	0,25 ± 0,02
DHZR	<LOD	<LOD	<LOD
DHZROG	<LOD	<LOD	<LOD
DHZ7G	2,83 ± 0,10	3,56 ± 0,29	4,42 ± 0,17
DHZ9G	0,33 ± 0,03	0,35 ± 0,08	0,41 ± 0,05
DHZ5'MP	<LOD	<LOD	<LOD
Celkové CK DHZ-typu	3,34 ± 0,14	4,12 ± 0,38	5,08 ± 0,23
iP	0,15 ± 0,03	0,22 ± 0,01	0,28 ± 0,07
iPR	1,65 ± 0,23	3,07 ± 0,45	3,06 ± 0,05
iP7G	26,10 ± 2,06	14,67 ± 0,27	20,76 ± 1,99
iP9G	2,50 ± 0,19	1,30 ± 0,04	1,74 ± 0,35
iPR5'MP	16,69 ± 1,40	23,67 ± 1,60	20,47 ± 2,38
Celkové CK iP-typu	47,09 ± 3,90	42,93 ± 2,36	46,32 ± 4,84

<LOD = pod limitem detekce

Tab. 2: Endogenní koncentrační hladiny cytokininů v 10denních semenáčcích *Arabidopsis thaliana* pěstovaných při světelných podmínkách 8h/16h, 12h/12h, 16h/8h za **letní období**. Výsledky jsou uvedeny ve tvaru: průměrná hodnota ± směrodatná odchylka, n= 3.

Světelné podmínky	8h/16h	12h/12h	16h/8h
typ cytokininu	Koncentrace [pmol/g FW]		
tZ	0,11 ± 0,01	0,15 ± 0,01	0,18 ± 0,02
tZOG	4,95 ± 0,25	5,26 ± 0,35	5,46 ± 0,09
tZR	1,09 ± 0,03	1,98 ± 0,14	3,39 ± 0,26
tZROG	<LOD	0,52 ± 0,07	0,55 ± 0,09
tZ7G	13,53 ± 0,57	16,08 ± 1,56	14,76 ± 0,78
tZ9G	4,81 ± 0,27	5,92 ± 0,47	5,80 ± 0,40
tZR5'MP	3,28 ± 0,02	5,28 ± 0,98	7,94 ± 2,66
Celkové CK tZ-typu	27,77 ± 1,16	35,17 ± 3,57	38,10 ± 4,30
cZ	0,12 ± 0,01	0,12 ± 0,03	0,12 ± 0,01
cZOG	1,66 ± 0,17	0,79 ± 0,05	1,00 ± 0,17
cZR	1,65 ± 0,26	2,26 ± 0,62	3,59 ± 0,49
cZROG	0,85 ± 0,15	0,82 ± 0,05	0,94 ± 0,19
cZ7G	14,25 ± 0,96	9,26 ± 0,25	9,85 ± 0,16
cZ9G	0,52 ± 0,04	0,37 ± 0,02	0,45 ± 0,06
cZR5'MP	<LOD	5,01 ± 0,35	6,81 ± 1,20
Celkové CK cZ-typu	19,04 ± 1,58	18,63 ± 1,36	22,77 ± 2,28
DHZ	<LOD	<LOD	<LOD
DHZOG	0,18 ± 0,02	0,22 ± 0,02	0,24 ± 0,01
DHZR	<LOD	<LOD	<LOD
DHZROG	<LOD	<LOD	<LOD
DHZ7G	2,33 ± 0,11	3,62 ± 0,44	3,82 ± 0,16
DHZ9G	0,37 ± 0,01	0,37 ± 0,07	0,40 ± 0,03
DHZ5'MP	<LOD	<LOD	<LOD
Celkové CK DHZ-typu	2,88 ± 0,15	4,20 ± 0,53	4,46 ± 0,21
iP	0,21 ± 0,00	0,23 ± 0,03	0,24 ± 0,01
iPR	2,33 ± 0,08	2,49 ± 0,44	4,88 ± 0,79
iP7G	24,63 ± 1,08	22,16 ± 1,54	21,01 ± 1,45
iP9G	2,35 ± 0,09	2,11 ± 0,22	1,91 ± 0,13
iPR5'MP	19,50 ± 2,87	29,60 ± 3,48	35,67 ± 8,95
Celkové CK iP-typu	49,04 ± 4,13	56,58 ± 5,71	63,70 ± 11,33

<LOD = pod limitem detekce

Tab. 3: Endogenní koncentrační hladiny cytokininů v 10denních semenáčcích *Arabidopsis thaliana* pěstovaných při světelných podmínkách 8h/16h, 12h/12h, 16h/8h za **podzimní období**. Výsledky jsou uvedeny ve tvaru: průměrná hodnota ± směrodatná odchylka, n= 3.

Světelné podmínky	8h/16h	12h/12h	16h/8h
typ cytokininu	Koncentrace [pmol/g FW]		
tZ	0,17 ± 0,03	0,45 ± 0,08	0,54 ± 0,06
tZOG	5,03 ± 0,81	6,04 ± 1,31	6,02 ± 0,32
tZR	2,05 ± 0,46	4,30 ± 0,39	4,65 ± 0,69
tZROG	1,01 ± 0,32	0,74 ± 0,04	1,42 ± 0,43
tZ7G	16,63 ± 2,43	20,34 ± 0,79	17,96 ± 0,70
tZ9G	6,10 ± 0,86	7,87 ± 0,19	6,90 ± 0,22
tZR5 MP	4,18 ± 0,31	6,48 ± 0,92	5,93 ± 1,31
Celkové CK tZ-typu	35,18 ± 5,21	46,22 ± 3,70	43,42 ± 3,74
cZ	0,14 ± 0,02	0,21 ± 0,03	0,25 ± 0,01
cZOG	1,25 ± 0,22	1,06 ± 0,11	0,96 ± 0,24
cZR	4,67 ± 2,20	7,99 ± 3,50	5,08 ± 0,63
cZROG	0,81 ± 0,15	1,07 ± 0,08	1,29 ± 0,23
cZ7G	11,40 ± 1,61	11,17 ± 1,37	8,52 ± 0,82
cZ9G	0,50 ± 0,06	0,52 ± 0,04	0,44 ± 0,01
cZR5 MP	7,53 ± 1,47	13,17 ± 0,00	10,94 ± 1,68
Celkové CK cZ-typu	26,31 ± 5,72	35,19 ± 5,12	27,47 ± 3,62
DHZ	<LOD	0,75 ± 0,18	0,90 ± 0,20
DHZOG	0,21 ± 0,05	0,29 ± 0,07	0,35 ± 0,01
DHZR	<LOD	<LOD	<LOD
DHZROG	0,57 ± 0,30	0,46 ± 0,14	0,66 ± 0,17
DHZ7G	3,62 ± 0,51	4,88 ± 0,28	5,57 ± 0,29
DHZ9G	0,39 ± 0,04	0,58 ± 0,05	0,83 ± 0,01
DHZ5 MP	<LOD	<LOD	<LOD
Celkové CK DHZ-typu	4,79 ± 0,89	6,96 ± 0,72	8,31 ± 0,69
iP	0,23 ± 0,00	0,45 ± 0,04	0,49 ± 0,05
iPR	3,34 ± 1,12	4,66 ± 0,77	5,61 ± 1,41
iP7G	20,48 ± 3,22	24,84 ± 0,53	18,55 ± 0,86
iP9G	1,88 ± 0,27	2,30 ± 0,10	1,77 ± 0,06
iPR5 MP	28,71 ± 5,82	39,01 ± 2,58	35,25 ± 0,59
Celkové CK iP-typu	54,63 ± 10,44	71,26 ± 4,02	61,67 ± 2,97

<LOD = pod limitem detekce

Tab. 4: Endogenní koncentrační hladiny cytokininů v 10denních semenáčcích *Arabidopsis thaliana* pěstovaných při světelných podmínkách 8h/16h, 12h/12h, 16h/8h za **zimní období**. Výsledky jsou uvedeny ve tvaru: průměrná hodnota ± směrodatná odchylka, n= 3.

Světelné podmínky	8h/16h	12h/12h	16h/8h
typ cytokininu	Koncentrace [pmol/g FW]		
tZ	0,15 ± 0,02	0,17 ± 0,01	0,18 ± 0,02
tZOG	5,07 ± 0,12	5,58 ± 0,66	4,94 ± 0,17
tZR	1,80 ± 0,11	2,29 ± 0,14	3,42 ± 0,71
tZROG	0,59 ± 0,03	0,96 ± 0,36	0,71 ± 0,13
tZ7G	16,56 ± 0,52	16,24 ± 1,46	14,79 ± 0,59
tZ9G	6,23 ± 0,12	6,39 ± 0,67	5,82 ± 0,55
tZR5`MP	3,00 ± 0,34	4,03 ± 0,70	5,69 ± 0,66
Celkové CK tZ-typu	33,40 ± 1,25	35,66 ± 3,99	35,55 ± 2,82
cZ	0,16 ± 0,01	0,14 ± 0,03	0,13 ± 0,03
cZOG	1,43 ± 0,22	1,64 ± 0,20	1,08 ± 0,34
cZR	4,06 ± 1,03	3,99 ± 0,65	3,05 ± 1,30
cZROG	1,00 ± 0,16	1,19 ± 0,41	1,04 ± 0,22
cZ7G	10,94 ± 0,87	9,37 ± 0,70	7,80 ± 0,30
cZ9G	0,51 ± 0,05	0,41 ± 0,02	0,34 ± 0,03
cZR5`MP	6,18 ± 0,56	6,16 ± 0,89	5,57 ± 1,52
Celkové CK cZ-typu	24,28 ± 2,90	22,90 ± 2,90	19,01 ± 3,73
DHZ	<LOD	<LOD	<LOD
DHZOG	0,29 ± 0,02	0,28 ± 0,01	0,31 ± 0,03
DHZR	<LOD	<LOD	<LOD
DHZROG	<LOD	0,61 ± 0,13	<LOD
DHZ7G	2,76 ± 1,35	4,03 ± 0,14	4,02 ± 0,39
DHZ9G	0,31 ± 0,04	0,39 ± 0,04	0,37 ± 0,02
DHZ5`MP	<LOD	<LOD	<LOD
Celkové CK DHZ-typu	3,37 ± 1,40	5,31 ± 0,32	4,70 ± 0,44
iP	0,26 ± 0,05	0,20 ± 0,01	0,27 ± 0,04
iPR	2,61 ± 0,31	3,50 ± 0,68	3,58 ± 0,19
iP7G	18,53 ± 0,33	18,55 ± 0,98	14,04 ± 0,85
iP9G	1,72 ± 0,07	1,70 ± 0,11	1,22 ± 0,07
iPR5`MP	23,29 ± 2,22	25,17 ± 1,75	25,84 ± 2,15
Celkové CK iP-typu	46,40 ± 2,98	49,13 ± 3,52	44,96 ± 3,31

<LOD = pod limitem detekce